

Bibliographic Fields**D cument Identity**

(19)【発行国】

日本国特許庁 (JP)

【公報種別】

再公表特許 (A1)

(11)【国際公開番号】

WO01/019986

【発行日】

平成15年4月2日 (2003. 4. 2)

(19) [Publication Office]

Japan Patent Office (JP)

[Kind of Document]

Japanese Republished Patent Publication (A1)

(11) [International Publication Number]

WO 01/019986

[Publication Date]

Heisei 15 year April 2 day (2003.4. 2)

International Filing

(11)【国際公開番号】

WO01/019986

(21)【国際出願番号】

PCT/JP00/06265

(22)【国際出願日】

平成12年9月13日 (2000. 9. 13)

(43)【国際公開日】

平成13年3月22日 (2001. 3. 22)

(81)【指定国】

EP (AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE) OA (BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG) AP (GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW) UA (AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM) AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

(11) [International Publication Number]

WO 01/019986

(21) [International Application Number]

PCT/JP00/06265

(22) [International Application Date]

2000 September 13 days (2000.9.13)

(43) [International Publication Date]

Heisei 13 year March 22 day (2001.3.22)

(81) [Designated States]

EP (AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE) OA (BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG) AP (GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW) UA (AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM) AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Technical

(54)【発明の名称】

ペプチドロイコトリエン受容体

(51)【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 31/422

A61P 9/08

(54) [Title of Invention]

PEPTIDE LEUCOTRIENE RECEPTOR

(51) [International Patent Classification, 7th Edition]

C12N 15/09 ZNA

A61K 31/422

A61P 9/08

THIS PAGE IS BLANK (USPS TO)

43/00	43/00
C07D413/12	C07D413/12
C07K 14/705	C07K 14/705
16/28	16/28
C12P 21/02	C12P 21/02
C12Q 1/02	C12Q 1/02
// G01N 33/15	//G01N 33/15
33/50	33/50
【FI】	【FI】
C12N 15/00 ZNA A	C12N 15/00 ZNA A
A61K 31/422	A61K 31/422
A61P 9/08	A61P 9/08
43/00	43/00
C07D413/12	C07D413/12
C07K 14/705	C07K 14/705
16/28	16/28
C12P 21/02 C	C12P 21/02 C
C12Q 1/02	C12Q 1/02
G01N 33/15 Z	G01N 33/15 Z
33/50 Z	33/50 Z
【全頁數】	【Number of Pages in Document】
82	82

Filing

【審査請求】

有

【予備審査請求】

有

【出願番号】

特願2001-523757(P2001-523757)

(22)【国際出願日】

平成12年9月13日(2000. 9. 13)

【Request for Examination】

Possession

【Provisional Request for Examination】

Possession

【Domestic Application Number】

Japan Patent Application 2001 - 523757 (P2001 - 523757)

(22) [International Application Date]

2000 September 13 days (2000.9.13)

Foreign Priority

(31)【優先権主張番号】

(31) [Priority Application Number]

特願平11-259986

Japan Patent Application Hei 11 - 259986

(32)【優先日】

(32) [Priority Date]

1 PAGE BLANK (USPTO)

平成11年9月14日(1999. 9. 14)

1999 September 14 days (1999.9.14)

(33)【優先権主張国】

(33) [Priority Country]

日本(JP)

Japan (JP)

Parties**Applicants**

(71)【出願人】

(71) [Applicant]

【氏名又は名称】

[Name]

山之内製薬株式会社

**YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO. LTD. (DB
69-055-2690)**

【住所又は居所】

Tokyo Prefecture Chuo-ku Nihonbashi Honmachi 2-3-11

(71)【出願人】

(71) [Applicant]

【氏名又は名称】

[Name]

株式会社ヘリックス研究所

KK HELIX RESEARCH LABORATORY

【住所又は居所】

[Address]

千葉県木更津市矢那1532番地3

Chiba Prefecture Kisarazu City arrow 那 153 second areas 3

Inventors

(72)【発明者】

(72) [Inventor]

【氏名】

[Name]

高崎 淳

Takasaki Atsushi

【住所又は居所】

[Address]

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式
会社内Inside of Ibaraki Prefecture Tsukuba City Miyukigaoka 21
Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd. (DB 69-055-2690)

(72)【発明者】

(72) [Inventor]

【氏名】

[Name]

蒲原 正純

Masazumi Kanbara

【住所又は居所】

[Address]

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式
会社内Inside of Ibaraki Prefecture Tsukuba City Miyukigaoka 21
Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd. (DB 69-055-2690)

(72)【発明者】

(72) [Inventor]

【氏名】

[Name]

松本 光之

Matsumoto Mitsuyuki

【住所又は居所】

[Address]

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式
会社内Inside of Ibaraki Prefecture Tsukuba City Miyukigaoka 21
Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd. (DB 69-055-2690)

(72)【発明者】

(72) [Inventor]

THIS PAGE BLANK (USPS)

【氏名】

齋藤 哲

【住所又は居所】

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72)【発明者】

【氏名】

杉本 貴

【住所又は居所】

東京都板橋区蓮根3-17-1 山之内製薬株式会社内

(72)【発明者】

【氏名】

太田 紀夫

【住所又は居所】

神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-7-105

(72)【発明者】

【氏名】

磯貝 隆夫

【住所又は居所】

茨城県稲敷郡阿見町大室511-12

(72)【発明者】

【氏名】

西川 哲夫

【住所又は居所】

東京都板橋区氷川町27-3-403

(72)【発明者】

【氏名】

河合 弓利

【住所又は居所】

千葉県木更津市矢那4508-19-201

Agents

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】

[Name]

Saito Satoru

[Address]

Inside of Ibaraki Prefecture Tsukuba City Miyukigaoka 21
Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd. (DB 69-055-2690)

(72) [Inventor]

[Name]

Sugimoto Tooru

[Address]

Inside of Tokyo Prefecture Itabashi-ku Hasune 3 - 17 - 1
Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd. (DB 69-055-2690)

(72) [Inventor]

[Name]

Ota Norio

[Address]

Kanagawa Prefecture Fujisawa City Tsujido Shinmachi 1 - 2 -
7 - 105

(72) [Inventor]

[Name]

Isogai Takao

[Address]

Ibaraki Prefecture Inashiki-gun Amimachi Omuro 511 - 12

(72) [Inventor]

[Name]

Nishikawa Tetsuo

[Address]

Tokyo Prefecture Itabashi-ku ice river Cho 27 - 3 - 403

(72) [Inventor]

[Name]

Kawai bow interest

[Address]

Chiba Prefecture Kisarazu City arrow 那 4508 - 19 - 201

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

[Name]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

清水 初志 (外1名)

clean water original intention (1 other)

Abstract**(57)【要約】**

新規 LTC₄ 受容体タンパク質をコードする cDNA を単離した。

新規タンパク質である LTC₄ 受容体の提供により、LTC₄ を用いた結合実験が可能となった。

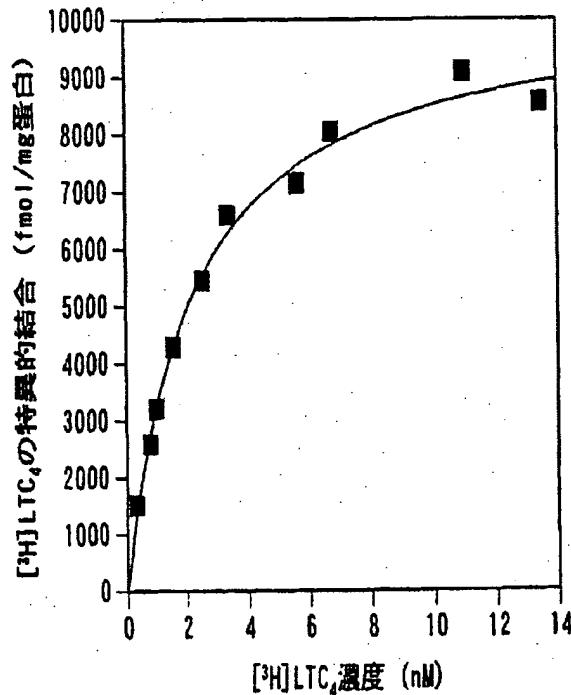
結合実験に基づく LTC₄ 受容体の活性を修飾する化合物のスクリーニングによって、LTC₄ 受容体を標的とする医薬開発が可能となる。

(57) [Abstract]

cDNA which novel LTC₄receptor protein quality cord is done was isolated.

binding experiment which uses LTC₄ with offer of LTC₄receptor which is a novel protein, became possible.

With screening of compound which decorates activity of LTC₄receptor which is based on binding experiment, medicine development which designates LTC₄receptor as target becomes possible.

**Claims****【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号:2、配列番号:18、および配列番号:22 のいずれかに記載のアミノ酸配列、または配列番号:2、配列番号:18、および配列番号:22 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および/または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を含み、ロイコトリエンC4 受容体活性を有するタンパク質。

[Claim(s)]**[Claim 1]**

protein, where amino acid of 1 or plural is deficient in amino acid sequence, which is stated in any of Sequence Number:2, Sequence Number:18, and Sequence Number:22 or amino acid sequence which is stated in any of Sequence Number:2, Sequence Number:18, and Sequence Number:22, is decorated by substitution includes amino acid sequence which with addition and insertion and/or other amino acid, possesses leucotriene C4 receptor activity

THIS PAGE BLANK (USPTO)

【請求項 2】

配列番号:1、配列番号:17、および配列番号:21のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジメントな条件下でハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、ロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質。

【請求項 3】

請求項 1、または請求項 2 に記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載のタンパク質を製造する方法。

【請求項 6】

請求項 1 または請求項 2 に記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項 7】

次の工程を含む、被験化合物のロイコトリエン C4 受容体活性を修飾する活性の検出方法。

a)ロイコトリエン C4 受容体のリガンドの存在下で請求項 1 または 2 に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、

b)ロイコトリエン C4 受容体活性の変化を測定する工程

【請求項 8】

次の工程を含むロイコトリエン C4 受容体活性を修飾する物質のスクリーニング方法。

a)ロイコトリエン C4 受容体のリガンドの存在下で請求項 1 または 2 に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、

b)ロイコトリエン C4 受容体活性の変化を測定する工程

c)ロイコトリエン C4 受容体活性を修飾する物質を選択する工程

【請求項 9】

[Claim 2]

Under DNA and stringent condition which consist of nucleotide sequence which is stated in any of Sequence Number:1, Sequence Number:17, and Sequence Number:21 hybridize DNA which is done code with protein which is done, protein, which possesses leucotriene C4 receptor activity

[Claim 3]

DNA, which protein which is stated in Claim 1, or Claim 2 code is done

[Claim 4]

DNA which is stated in Claim 3 revelation transformed host, which possibly is kept

[Claim 5]

method, which produces protein where it cultures transformed host which is stated in Claim 4, expressed product includes step which recovers, states in Claim 1 or Claim 2

[Claim 6]

antibody, for protein which is stated in Claim 1 or Claim 2

[Claim 7]

detection method, of activity which includes following step, decorates leucotriene C4 receptor activity of compound being tested

protein, which under existing of ligand of a)leucotriene C4 receptor is stated in Claim 1 or 2 or transformed cell and compound being tested which reveal this protein step, which contacts

step which measures change of b)leucotriene C4 receptor activity

[Claim 8]

screening method, of substance which decorates leucotriene C4 receptor activity which includes the following step

protein, which under existing of ligand of a)leucotriene C4 receptor is stated in Claim 1 or 2 or transformed cell and compound being tested which reveal this protein step, which contacts

step which measures change of b)leucotriene C4 receptor activity

step which selects substance which decorates c)leucotriene C4 receptor activity

[Claim 9]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

請求項 1、または請求項 2 に記載のロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む抗炎症用、または抗アレルギー用医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 1、または請求項 2 に記載のロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む血管拡張用医薬組成物。

Specification

【発明の詳細な説明】

技術分野 本発明は、新規なペプチドロイコトリエン受容体タンパク質、この新規なタンパク質をコードしている DNA、該 DNA を含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換細胞及び該細胞を使用した薬物スクリーニング法に関する。

背景技術

プロスタグランジンやトロンボキサン、ロイコトリエンのようなエイコサノイドはアラキドン酸の代謝産物の一つのファミリーであり、生体のホメオスタシスを維持するために様々な生理作用を発揮している(講座プロスタグランジン 1~8、鹿取信、室田誠逸、山本尚三 編(1988)参照)。

それらの生理作用はそれぞれのエイコサノイドに特有の細胞膜受容体を介して発現すると考えられている。

エイコサノイドの一つであるロイコトリエンは、アラキドン酸の 5-リポキシゲナーゼ系の代謝産物の中で低濃度で強い生理活性を示す一連の生理活性脂質である (Samuelsson,B.et al.(1987)Science.237,1171-1176)。

ロイコトリエン類はロイコトリエン B4(LTB₄)と、脂肪酸にペプチドが結合したペプチドロイコトリエンの二つに大別される。

後者のペプチドロイコトリエンとしては、ロイコトリエン C4(LTC₄)、ロイコトリエン D4(LTD₄)、およびロイコトリエン E4(LTE₄)が知られている。

LTB₄ は白血球の強力な活性化因子であり、炎症免疫反応や感染防御などで重要な役割を果たしている (Chen,X.S.et al.(1994)Nature 372,p179-182)。

一方、LTC₄、LTD₄、および LTE₄ は、気道平滑筋をはじめとする種々の平滑筋の収縮、気道の粘膜分泌亢進、細動静脈の収縮、血清成分の

For anti-inflammatory or use against allergy medicine composition, which includes antagonist of protein which possesses leucotriene C4 receptor activity which is stated in Claim 1, or Claim 2 and additive which is allowed in pharmacological

[Claim 10]

Medicine composition, for vasodilation which includes antagonist of protein which possesses leucotriene C4 receptor activity which is stated in Claim 1, or Claim 2 and additive which is allowed in pharmacological

【Description of the Invention】

technological field this invention, novel peptide leucotriene receptor protein quality, regards drug screening method which uses transformed cell and said cell which contain vector, said vector which contains DNA, said DNA which this novel protein cord has been done.

background technology

eicosanoid like prostaglandin and thromboxane, leucotriene with family of one of metabolite of arachidonic acid, has shown various physiological action in order to maintain homeostasis of organism, (chaired laboratory prostaglandin 1~8, Katori trust, Murota Seiitsu, Yamamoto Shozo compilation (1988)reference).

Those physiological action through plasma membrane receptor which is peculiar to respective eicosanoid are thought that it reveals.

leucotriene which is a one of eicosanoid is consecutive physiological activity lipid which 5-lipoxygenase in metabolite of system of arachidonic acid shows strong physiological activity with low concentration, (Samuelsson,B.et al. (1987) Science.237,1171-1176).

leucotriene leucotriene B4 (LTB₄) with, are roughly classified to two of peptide leucotriene which peptide connects to fatty acid.

As peptide leucotriene of the latter, leucotriene C4 (LTC₄), leucotriene D4 (LTD₄), and leucotriene E4 (LTE₄) is known.

LTB₄ with strong activating factor of white blood cell, has carried out important role with such as inflammation immune reaction and infection defense, (Chen,X.S. et al. (1994) Nature (London) (0028-0836) 372,p179-182).

On one hand, LTC₄, LTD₄, and LTE₄, have contraction of the various smooth muscle which begins air passage smooth muscle, contraction of mucosa secretion accentuation,

THIS PAGE BLANK (USPTO)
THIS PAGE BLANK (USPTO)

漏出などの作用を持っている(Taylor,G.W.et al.(1986)Trends Pharmacol.Sci.7,p100-103)。

このような作用から、ペプチドロイコトリエンは、炎症やアレルギー性症状、例えば喘息や気管支炎やアレルギー性鼻炎などの呼吸器疾患、乾せんや皮膚炎などの皮膚疾患、inflammatory bowel disease や潰瘍性大腸炎などの腸疾患、の発症、進展、増悪に関与していると考えられている(鹿取信、室田誠逸、山本尚三 編(1988)講座プロスタグランジン3,225-227,484-486,Piper,P.J.et al.(1984)Physiol.Rev.64.744-761,Taylor,G.W.et al.(1986)Trends Pharmacol.Sci.7.100-103,Lewis,R.A.et al.(1990)N.Engl.J.Med.323.654-655)。

また、ペプチドロイコトリエン(LTC₄ および LTD₄)は心収縮力や冠血流量の著名な低下をもたらすことが知られており(鹿取信、室田誠逸、山本尚三 編(1988)講座プロスタグランジン2,64-70,Piper,P.J.et al.(1984)Physiol.Rev.64.744-761,Letts,L.G.et al.,(1982)Br.J.Pharmacol.76,169-176,Chiono,M.et al.,(1991)J.Pharmacol.Exp.Ther.256,1042-1048)、心臓血管障害との関連が指摘されている。

以上のことから、ロイコトリエン類の受容体の構造および性質を明らかにすることはロイコトリエン類の生理的役割の解明、引いては、ロイコトリエン類の関与する疾患の解明、治療法の発見等につながるものと考えられる。

現在までに、IUPHAR(International union of Pharmacology)によって、ロイコトリエンの受容体は薬理学的にBLT受容体、CysLT1受容体、およびCysLT2受容体の3つに分類されている(Alexander,S.P.H.et al.(1997)Trends Pharmacol.Sci.(Suppl.)50-51)。

BLT受容体は、LTB₄を特異的に認識する受容体である。

CysLT1受容体とCysLT2受容体は、いずれもペプチドロイコトリエンを認識する受容体である。

CysLT1受容体が、既存の古典的LTD₄受容体拮抗薬(ICI204219、MK476、SR2640、SKF104353、LY170680等)でその生物作用が遮断されるのに対して、CysLT2受容体は遮断されない。

fibrillation vein of the air passage and leakage or other action of blood serum component, (Taylor,G.W.et al. (1986) Trends Pharmacol.Sci.7,p100-103).

From at this kind of action, as for peptide leucotriene, it is thought that it has participated in pathogenesis, development and increase badness of the inflammation and allergic disease, for example asthma and bronchitis and allergic rhinitis or other respiratory disease, psoriasis and dermatitis or other dermatitis, inflammatory bowel disease and the ulcerative colitis or other intestinal disease, (Katori trust, Murota Seiatsu, Yamamoto Shozo compilation (1988) chaired laboratory prostaglandin 3,225-227,484-486,Piper,P.J.et al. (1984) Physiological Reviews (0031 - 9333, PHREA7) 64.744 - 761, Taylor,G.W.et al. (1986) Trends Pharmacol.Sci.7.100-103,Lewis,R.A.et al. (1990) N.Engl.J.Med.323.654-655).

In addition, peptide leucotriene (LTC₄ and LTD₄) brings prominent decrease of cardiac contractility and coronary blood flow, it is known and (Katori trust, Murota Seiatsu, Yamamoto Shozo compilation (1988) chaired laboratory prostaglandin 2,64-70,Piper,P.J.et al. (1984) Physiological Reviews (0031 - 9333, PHREA7) 64.744 - 761, Letts,L.G.et al., (1982) British Journal of Pharmacology (0007 - 1188, BJPCB) 76,169 - 176, Chiono,M.et al., (1991) Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (0022 - 3565, JPETAB) 256 and 104 2 - 1048), relation with cardiovascular damage is pointed out.

From thing above, structure of receptor of leucotriene and making the property clear elucidation of physiological role of leucotriene, pulling, are thought thing which is connected to elucidation of disease where leucotriene participate and discovery etc of treatment method.

To presently, with IUPHAR (international union of pharmacology), receptor of leucotriene in pharmacological classification is done in 3 of BLT receptor, CysLT1 receptor, and CysLT2 receptor, (Alexander,S.P.H.et al. (1997) Trends Pharmacol.Sci. (Suppl.) 50 - 51).

BLT receptor is receptor which recognizes LTB₄ in specific.

CysLT1 receptor and CysLT2 receptor are receptor which in each case recognizes peptide leucotriene.

CysLT1 receptor, as for CysLT2 receptor shielding is not done biological action vis-a-vis shielding being done with existing classical LTD₄ receptor antagonist (ICI 204219, MK476, SR2640, SKF104353, LY170680 etc).

THIS PAGE BLANK (USF)

その他、CysLT1 受容体や CysLT2 受容体とは異なるペプチドロイコトリエン受容体の存在を示唆する報告もある (Jonsson, E.W. et al. (1998) Eur.J.Pharmacol. 357, 203-211)。

ロイコトリエン受容体遺伝子としては、BLT 受容体がヒト (Yokomizo, T. et al. (1997) Nature 387, 620-624) 、マウス (Martin, V. et al. (1999) J.Biol.Chem. 274, 8597-8603) で単離同定されている。

また、最近、CysLT1 受容体がヒトで単離同定され、LTD₄ が親和性の高いリガンドであることが判明した。

(Lynch, K.R. et al. (1999) Nature 399, 789-793)。

しかしながら現時点では、CysLT1 受容体以外のペプチドロイコトリエンの受容体、とくに、LTC₄ に親和性の高い受容体の遺伝子は如何なる種においても単離同定されていない。

さらには、これまで、抗炎症薬を目指して BLT 受容体の拮抗薬 (Negro, J.M. et al. (1997) Allergol. Immunopathol. Madr. 25, 104-112, Kishikawa, K. et al. (1995) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res. 23, 279-281) や CysLT1 受容体の拮抗薬 (Leff, J.A. et al. (1998) N. Engl. J. Med. 339, 147-152, Suisa, S. et al. (1997) Amm. Int. Med. 126, 177-183, Grossman, J. et al. (1997) J. Asthma 34, 321-328) が研究開発されている。

一方、ロイコトリエン受容体のなかでも特に LTC₄ に親和性の高い受容体については、拮抗薬、作動薬の研究開発は進んでいない (Gardiner, P.J. et al. (1994) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res. 22, 49-61, Capra, V. et al. (1998) Mol. Pharmacol. 53, 750-758)。

LTC₄ と受容体との結合が、Glutathione S-transferase や LTC₄Synthase のような細胞や組織が持つ親和性の低い LTC₄ 結合タンパク質にマスクされてしまうため、細胞や組織標本を用いた結合実験が困難なことが主な原因である。

したがって、インビトロでの結合実験を可能とする LTC₄ 受容体の提供が望まれている。

発明の開示

本発明の課題は、ヒトの LTC₄ 受容体または該受容体と同等の機能を有するタンパク質と、そ

In addition, CysLT1 receptor and CysLT2 receptor there is also report which suggests existence of peptide leucotriene receptor which differs, (Jonsson, E.W. et al. (1998) European Journal of Pharmacology (0014 - 2999, EJPRAZ) 357, 203-211).

As leucotriene receptor gene, BLT receptor human (Yokomizo, T. et al (1997) Nature (London) (0028 - 0836) 387.620 - 624), isolation and identification is done with mouse (Martin, V. et al. (1999) Journal of Biological Chemistry (0021 - 9258, JBCHA3) 274.8597 - 8603).

In addition, recently, CysLT1 receptor being human, isolation and identification it was done, it is a ligand where LTD₄ affinity is high, it was ascertained.

(Lynch, K.R. et al. (1999) Nature (London) (0028 - 0836) 399, 789 - 793).

But with now, receptor, of peptide leucotriene other than CysLT1 receptor especially, as for gene of receptor where affinity is high in LTC₄ isolation and identification it is not done regarding whatever kind.

Furthermore, so far, aiming toward anti-inflammation drug, antagonist of BLT receptor (Negro, J.M. et al. (1997) Allergol. Immunopathol. Madr. 25, 104-112, Kishikawa, K. et al. (1995) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res. 23, 279-281) and antagonist (Leff, J.A. et al. (1998) N. Engl. J. Med. 339, 147-152, Suisa, S. et al. (1997) Amm. Int. Med. 126, 177-183, Grossman, J. et al. (1997) J. Asthma 34, 321-328) of CysLT1 receptor is done research and development.

On one hand, research and development of antagonist, activator is not advanced concerning the receptor where even in leucotriene receptor affinity is high in especially LTC₄, (Gardiner, P.J. et al. (1994) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res. 22, 49-61, Capra, V. et al. (1998) Molecular Pharmacology (0026 - 895 X) 53, 750 - 758).

Because connection with LTC₄ and receptor, mask it is done in LTC₄ binding protein where affinity which cell and organization like the Glutathione S-transferase and LTC₄Synthase have is low, binding experiment which uses cell and organization preparation is difficult, it is a main cause.

Therefore, offer of LTC₄ receptor which makes binding experiment with in-vitro possible is desired.

Disclosure of Invention

problem of this invention, protein which possesses function which is equal to LTC₄ receptor or said receptor of human and,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

れをコードする遺伝子の提供である。

また本発明は、LTC₄受容体タンパク質を使用したペプチドロイコトリエン受容体を標的とする薬物として有用な化合物のスクリーニング法の提供をも課題としている。

本発明者らは、LTC₄受容体をコードするDNAの単離のために、ヒト全長cDNAライブラリーの利用が有効なのではないかと考えた。

LTC₄受容体タンパク質の単離が望まれながら、これまで達成できていないことから、まったく新しいアプローチを試みることには意義がある。

特に、タンパク質コード領域を確実に含む全長cDNAライブラリーを用いることにより、未知のタンパク質の単離を迅速に達成できると考えた。

翻訳開始コドンを備えた全長cDNAを細胞に導入すれば、容易にタンパク質の機能を確認できるためである。

本発明者らは、まずオリゴキヤップ法[K.Maruyama and S.Sugano, Gene, 138:171-174(1994); Y.Suzuki et al., Gene, 200:149-156(1997)]によって全長率の高いヒトcDNAライブラリーを合成した。

次いでこのcDNAライブラリーから単離したクローンから、ヒト全長cDNAをクローニングした。

更にこうして得られた全長cDNAクローンの中から、膜受容体をコードすると推定されるcDNAを選択するために、シグナル配列、あるいは膜貫通領域を含むアミノ酸配列をコードするcDNAクローンを選択した。

こうして絞り込まれたcDNAクローンの中に、COS細胞に形質転換することによってロイコトリエンC4(LTC₄)受容体活性を有するタンパク質をコードするcDNAを確認した。

更に、このcDNAによってコードされるタンパク質を用いてLTC₄受容体の活性を修飾する化合物のスクリーニングが可能となることを見出した。

更に、このcDNAのブタとラットにおけるホモログを単離し、それらがいずれもLTC₄受容体活性を有するタンパク質をコードしていることを明らかにした。

また本発明の受容体はLTC₄受容体活性のみならず、LTD₄受容体活性をも併せ持つことを明らかにし、本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下のタンパク質、このタンパク質をコードするDNA、並びにそれらの用途

一覧表

that cord isoffer of gene which is done.

In addition this invention has designated also offer of screening method of useful compound as problem as drug which designates peptide leucotriene receptor which uses LTC₄receptor protein quality as target.

As for these inventors, that you thought whether for isolating DNA which LTC₄receptor cord is done, utilization of human total length cDNA library is not effective.

While isolation of LTC₄receptor protein quality being desired, so far being able to achieve from fact that it is not, there is a meaning in trying the completely new approach.

Especially, you thought that isolation of protein of unknown can be achieved quickly, by using total length cDNA library which includes protein code region securely.

If total length cDNA which has translation initiation codon is introduced into cell, is because function of protein can be verified easily.

these inventors synthesized human cDNA library whose total length ratio is high first with oligo cap method [K.Maruyama and S.Sugano, Gene (0378 - 1119, GENED6), 138: 171 - 174 (1994); Y.Suzuki et al., Gene (0378 - 1119, GENED6), 200: 149 - 156 (1997)].

From clone which is isolated next from this cDNA library, human total length cDNA the cloning was done.

Furthermore in this way, in order to select cDNA which is presumed that from midst of total length cDNA clone which is acquired, membrane receptor cord is done, cDNA clone which amino acid sequence which includes signal sequence, or membrane spanning region cord is done was selected.

In this way, drawing in cDNA clone which is packed, in COS cell the transformation it does, cDNA which protein which possesses leucotriene C4 (LTC₄) receptor activity with cord is done was verified.

Furthermore, screening of compound which decorates activity of the LTC₄receptor making use of protein which cord is done with this cDNA becomes possible, you discovered.

Furthermore, pig of this cDNA and homo log in rat are isolated, those protein which in each case possesses LTC₄receptor activity the cord is done, it made clear.

In addition receptor of this invention LTC₄receptor activity furthermore, it has also LTD₄receptor activity, it made clear, completed this invention.

Namely this invention regards DNA, and those application which this protein of protein, below cord are done.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

に関する。

[1]配列番号:2、配列番号:18、および配列番号:22 のいずれかに記載のアミノ酸配列、または配列番号:2、配列番号:18、および配列番号:22 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および/または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を含み、ロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質。

[2]配列番号:1、配列番号:17、および配列番号:21 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、ロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質。

[3][1]、または[2]に記載のタンパク質をコードする DNA。

[4][3]に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体。

[5][4]に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、[1]または[2]に記載のタンパク質を製造する方法。

[6][1]または[2]に記載のタンパク質に対する抗体。

[7]次の工程を含む、被験化合物のロイコトリエン C₄ 受容体活性を修飾する活性の検出方法。

a)ロイコトリエン C4 受容体のリガンドの存在下で[1]または[2]に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、

b)ロイコトリエン C4 受容体活性の変化を測定する工程

[8]次の工程を含むロイコトリエン C4 受容体活性を修飾する物質のスクリーニング方法。

a)ロイコトリエン C4 受容体のリガンドの存在下で[1]または[2]に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、

b)ロイコトリエン C4 受容体活性の変化を測定する工程

c)ロイコトリエン C4 受容体活性を修飾する物質を選択する工程

[9][1]、または[2]に記載のロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと

protein。 where amino acid of 1 or plural is deficient in [1] Sequence Number:2、 Sequence Number:18、 and amino acid sequence, which is stated in any of Sequence Number:22 or the amino acid sequence which is stated in any of Sequence Number:2、 Sequence Number:18、 and Sequence Number:22, isdecorated by substitution includes amino acid sequence which with additionand insertion and/or other amino acid , possesses leucotriene C4 receptor activity

Under DNA and stringent condition which consist of [2] Sequence Number:1、 Sequence Number:17、 and the nucleotide sequence which is stated in any of Sequence Number:21 hybridize DNA which is done cord with protein which is done, protein。 whichpossesses leucotriene C4 receptor activity

[3] [1] Or DNA。 which protein which is stated in [2] cord is done

DNA which is stated in [4] [3] revelation transformed host. whichpossibly is kept

method. which produces protein where it cultures transformed host whichis stated in [5] [4], expressed product includes step which recovers,states in [1] or [2]

antibody。 for protein which is stated in [6] [1] or [2]

detection method。 of activity which [7] includes following step,decorates leucotriene C₄receptor activity of compound being tested

protein、 which under existing of ligand of a)leucotriene C4 receptor is stated in[1] or [2] or transformed cell and compound being tested which reveal this protein the step, which contacts

step which measures change of b)leucotriene C4 receptor activity

[8] screening method。 of substance which decorates leucotriene C4 receptor activity which includes thefollowing step

protein、 which under existing of ligand of a)leucotriene C4 receptor is stated in[1] or [2] or transformed cell and compound being tested which reveal this protein the step, which contacts

step which measures change of b)leucotriene C4 receptor activity

step which selects substance which decorates c)leucotriene C4 receptor activity

[9] [1] Or for anti-inflammatory or use against allergy medicine composition。 which includes the antagonist of

THIS PAGE BLANK (U.S.P.T.O.)

製薬学的に許容される添加剤を含む抗炎症用、または抗アレルギー用医薬組成物。

[10] [1]、または[2]に記載のロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む血管拡張用医薬組成物。

あるいは本発明は、[1]または[2]に記載のロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む抗炎症用医薬組成物、抗アレルギー用医薬組成物、あるいは血管拡張用医薬組成物の製造における使用に関する。

更に本発明は、[8]に記載のスクリーニング方法によって得ることができる、[1]または[2]に記載のロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストに関する。

加えて本発明は、[8]に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物の、[1]または[2]に記載のロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストとしての使用に関する。

本発明は、LTC₄受容体タンパク質に関する。

本発明のタンパク質は、全長 cDNA ライブラリーを構成する全長 cDNA のクローニングから選択された cDNA によってコードされるタンパク質である。

また本発明のタンパク質は、本発明において明らかにされたヒト全長 cDNA の塩基配列情報に基づいて単離された、ブタおよびラットにおけるホモログである。

GenBank や SwissProt の検索結果によれば、配列番号:1 に示す塩基配列(約 2.8kb)と、この塩基配列によってコードされる推定アミノ酸配列(配列番号:2/346 アミノ酸残基)は新規である。

またこのタンパク質のブタおよびラットにおけるホモログとして単離されたタンパク質のアミノ酸配列、並びにそれをコードする塩基配列も新規である。

ブタに由来するタンパク質のアミノ酸配列は配列番号:18 に、またその cDNA の塩基配列を配列番号:17 に示した。

またラットに由来するタンパク質のアミノ酸配列は配列番号:22 に、またその cDNA の塩基配列を配列番号:19 に示した。

protein which possesses leucotriene C4 receptor activity which is stated in [2] and additive which is allowed in pharmacological

[10] [1] Or medicine composition, for vasodilation which includes antagonist of protein which possesses leucotriene C4 receptor activity which is stated in [2] and the additive which is allowed in pharmacological

Or as for this invention, it regards use in medicine composition, use against allergy medicine composition, for anti-inflammatory or producing of medicine composition for vasodilation which includes antagonist of protein which possesses leucotriene C4 receptor activity which is stated in [1] or [2] and additive which is allowed in the pharmacological.

Furthermore it regards antagonist of protein which possesses the leucotriene C4 receptor activity which it can acquire this invention, with screening method which is stated in [8], states in [1] or [2].

In addition, this invention regards use as antagonist of protein which possesses leucotriene C4 receptor activity which is stated, in [1] or [2] of compound which can be acquired with screening method which is stated in [8].

this invention regards LTC₄ receptor protein quality.

protein of this invention is protein which is done with the cDNA which is selected from clone of total length cDNA which total length cDNA library configuration is done.

In addition it is a homolog where protein of this invention, regarding to this invention, was isolated on basis of nucleotide sequence information of the human total length cDNA which makes clear, in pig and rat.

According to retrieval result of GenBank and SwissProt, nucleotide sequence which is shown in Sequence Number:1 (Approximately 2.8 kb) with, estimated amino acid sequence (Sequence Number:2/346 amino acid residue) which is novel with this nucleotide sequence.

In addition as pig of this protein and amino acid sequence, of protein which is isolated homolog in rat and that cord also the nucleotide sequence which is done is novel.

amino acid sequence of protein which derives in pig in Sequence Number:18, in addition showed nucleotide sequence of cDNA in Sequence Number:17.

In addition amino acid sequence of protein which derives in rat in the Sequence Number:22, in addition showed nucleotide sequence of cDNA in Sequence Number:19.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

本発明の LTC₄ 受容体タンパク質を構成するアミノ酸配列は、公知のヒト CysLT1 受容体とは 31%、ヒト BLT 受容体とは 20% の相同意を有していた。

一方、ブタとラットに由来するタンパク質とヒトのタンパク質を比較すると、次に示すような構造的な類似が見られた。

amino acid sequence which LTC₄receptor protein quality of this invention configuration is done, the human CysLT1 receptor of public knowledge 31%, human BLT receptor had had 20% homology.

On one hand, when protein of protein and human which derive in pig and rat is compared, you could see structural kind of resemblance which is shown next.

アミノ酸残基 ヒトとの相同意			
homology of amino acid residue human			
ヒト		346	—
human		346	—
ブタ		345	77.7%
pig		345	77.7%
ラット		309	72.6%
ラッ		309	72.6%

様に LTC₄ 受容体活性が確認された。

これらの事実に基づいて、本発明において単離されたこれらのタンパク質は、いずれもヒト LTC₄ 受容体のホモログであると考えられた。

本発明のタンパク質やその遺伝子、また、本発明のタンパク質の活性を調節する化合物は、LTC₄ やその受容体が関与する疾患の予防や治療への応用が考えられる。

前述のとおり、LTC₄ および LTD₄ 等のペプチドロイコトリエン類は、喘息、気管支炎、あるいはアレルギー性鼻炎などの呼吸器疾患、乾せんや皮膚炎などの皮膚疾患、inflammatory bowel disease や潰瘍性大腸炎などの腸疾患、などの発症、進展、増悪に関与していると考えられている。

また、ペプチドロイコトリエン (LTC₄ および LTD₄) は、心臓血管障害との関連も指摘されている。

したがって、本発明によって提供される LTC₄ 受容体は、これらの疾患や症状において重要な役割を果たしていると考えられる。

したがって、その活性を修飾する化合物は、これらの疾患の治療および/または予防のための医薬品として有用である。

Way LTC₄ receptor activity was verified.

On basis of these facts, regarding to this invention, these protein which are isolated, in each case were thought that it is a homolog of the human LTC₄ receptor.

As for protein and gene, of this invention and compound which adjusts activity of protein of this invention, you can think the application to prevention and treatment of disease where LTC₄ and receptor participate.

Aforementioned sort, LTC₄ and LTD₄ or other peptide leucotriene, are thought that it has participated in asthma, bronchitis, or allergic rhinitis or other respiratory disease, psoriasis and dermatitis or other dermatitis, inflammatory bowel disease and ulcerative colitis or other intestinal disease, or other pathogenesis, development and increase badness.

In addition, peptide leucotriene (LTC₄ and LTD₄) is pointed out also something with related to cardiovascular damage.

Therefore, as for LTC₄ receptor which is offered with this invention, it is thought that important role is carried out in these disease and disease.

Therefore, as for compound which decorates activity, it is useful as medical drug for treatment and/or prevention of these disease.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

たとえば LTC₄受容体と LTC₄の結合に干渉し、LTC₄受容体に刺激を伝達しない化合物は、LTC₄のアンタゴニスト(遮断薬)として作用する。

このような化合物は、LTC₄受容体を介する疾患の治療や予防に有用である。

また本発明の受容体は、LTD₄受容体活性も有するため、本受容体のアンタゴニストは LTD₄受容体のアンタゴニストとしても作用する。

したがって、前記の LTC₄と LTD₄の両者が関与する疾患の、より良い治療薬や予防薬となりうる。

本発明のタンパク質は、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。

組み換えタンパク質は、例えば、後述するように本発明の DNA を挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したタンパク質を精製することにより調製することが可能である。

あるいはインビトロトランスレーション(例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system.Dasso,M.C.,Jackson,R.J.(1989)NAR 17:3129-3144」参照)などによって、本発明のタンパク質を調製することも可能である。

一方、天然のタンパク質は、例えば、後述する本発明のタンパク質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる(Current Protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987)Publish.Jhon Wily & Sons Section 16.1-16.19)。

アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

また本発明には、配列番号:2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質のみならず、1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および/または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる、またはこれらを含むタンパク質であって、配列番号:2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。

「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が配列番号:2 からなるタンパク質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。

配列番号:2 からなるタンパク質が持つ生物学的特性とは、LTC₄の受容体として機能することに

It interferes to connection of for example LTC₄receptor and LTC₄, compound which does not transmit stimulus to LTC₄receptor operates antagonist of LTC₄ (blocker) as.

This kind of compound is useful in treatment and prevention of disease which minds the LTC₄receptor.

In addition as for receptor of this invention, because also LTD₄receptor activity has, as for antagonist of this receptor as antagonist of LTD₄receptor it operates.

Therefore, aforementioned LTC₄ and disease where both of LTD₄ participates, can become a better therapeutic and preventive.

protein of this invention, manufactures is possible as recombinant protein,in addition as natural protein.

It manufactures it is possible by refining protein where the recombinant protein, as for example mentioned later, introduces vector which inserts DNA of this invention into suitable host cell, reveals inside the transformed host.

Or, also with such as in-vitro translation (for example "On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system.Dasso,M.C.,Jackson,R.J. (1989) NAR 17: 31 29-31 44 " reference) it is possible to manufacture protein of this invention.

On one hand, it can manufacture natural protein, for example making use of the Affinity column which connects antibody for protein of this invention which it mentions later (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish.Jhon Wily & Sons Section 16. 1- 16.19).

antibody which is used for affinity-purified with polyclonal antibody and is good with monoclonal antibody .

In addition, protein which consists of amino acid sequence which is stated in Sequence Number:2 furthermore, amino acid of 1 or plural is deficient in this invention, consists of amino acid sequence which is decorated by substitution with addition and insertion and/or other amino acid, or with protein which includes these, identical protein is included in protein and functional which consists of amino acid sequence which is stated in Sequence Number:2 .

"Equality to functional" With, it has possessed biological characteristic which is equal to protein where protein which becomes object consists of Sequence Number:2, it means.

biological characteristic which protein which consists of Sequence Number:2 has, it is not anything less than

THIS PAGE BLANK (USPTO)

他ならない。

本発明における LTC₄受容体活性とは、LTC₄との結合親和性を備え、LTC₄との結合によって LTC₄用量依存的に細胞内における Ca⁺⁺濃度の上昇をもたらすことと定義される。

本発明における LTC₄との結合親和性とは、望ましくは解離定数 Kd=30nM 以下、より望ましくは Kd=5nM 以下の高い結合親和性を示す場合、そのタンパク質が LTC₄との結合親和性を有すると言うことができる。

更に本発明のタンパク質と同等の生物学的特性を有するタンパク質は、望ましくは LTD₄受容体活性を有する。

LTD₄受容体活性とは、LTD₄との結合親和性を備え、LTD₄との結合によって LTD₄用量依存的に細胞内における Ca⁺⁺濃度の上昇をもたらすことと定義される。

タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。

変異数は、典型的には、全アミノ酸の 10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の 5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の 1%以内である。

本発明に基づいて、本発明のタンパク質の部分ペプチド断片を得ることができる。

たとえば本発明のタンパク質の競合阻害剤として機能する、リガンドとの結合能を有する部分ペプチド断片が提供される。

また、抗体調製のための抗原ペプチドを得ることもできる。

部分ペプチド断片が本発明のタンパク質に特異的であるためには、配列番号:2 に記載されたアミノ酸配列から選択された連続する少なくとも 7 アミノ酸、好ましくは 8 アミノ酸以上、より好ましくは 9 アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。

本発明の部分ペプチド断片は、本発明のタンパク質に対する抗体や本発明のタンパク質の競合阻害剤の調製以外に、例えば、本発明のタンパク質に結合するリガンドのスクリーニングなどに利用し得る。

本発明の部分ペプチド断片は、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードする DNA に関する。

functioning as receptor of LTC₄.

LTC₄receptor activity in this invention, it has binding affinity of LTC₄, fact that rise of Ca⁺⁺concentration with connection with LTC₄ in intracellular in the LTC₄dose dependent is brought it is defined.

Of LTC₄ binding affinity in this invention, below dissociation constant Kd=30 nM , it is more desirable and when binding affinity whose or less of Kd=5 nM is high is shown, you say that protein has binding affinity of LTC₄, it is possible .

Furthermore protein which possesses biological characteristic which is equal to the protein of this invention has LTD₄receptor activity desirably.

LTD₄receptor activity, it has binding affinity of LTD₄, fact that rise of the Ca⁺⁺concentration with connection with LTD₄ in intracellular in LTD₄dose dependent is brought it is defined.

If as for quantity and mutation site of mutation of amino acid in the protein, function is kept there is not restriction.

Quantity of mutation, within 10% of all amino acid, within 5% of preferably all amino acid, furthermore is within 1% of preferably all amino acid in the typical .

On basis of this invention, partial peptide fragment of protein of this invention can be acquired.

partial peptide fragment which functions as competitive inhibition medicine of protein of the for example this invention, possesses binding ability of ligand is offered.

In addition, it can also obtain antigen peptide for antibody manufacturing.

In order for partial peptide fragment to be specific in protein of this invention, it was selected at least it consists of amino acid sequence of 7 it continues amino acid, preferably 8 amino acid or more and above more preferably 9 amino acid from amino acid sequence which is stated in the Sequence Number:2.

partial peptide fragment of this invention can utilize other than manufacturing competitive inhibition medicine of protein of antibody and this invention for protein of the this invention, in screening etc of ligand which is connected to protein of for example this invention.

It can produce partial peptide fragment of this invention, with suitable peptidase peptide synthesis method, of the for example genetic engineering technique, public knowledge or protein of this invention is cut off with .

In addition, this invention regards DNA which protein of the above-mentioned this invention code is done.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

本発明のDNAとしては、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNAの他、ゲノムDNA、化学合成DNAなども含まれる。

また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

このような塩基配列は、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定することができる(Crantham,R.et al.(1981)Nucleic Acids Res.,9 r43-r74)。

さらに、これら塩基配列のコドンの一部は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジエネシス(site specific mutagenesis)(Mark,D.F.et al.(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81,5662-5666)等にしたがって改変することができる。

本発明のDNAは、配列番号:2からなるタンパク質をコードするDNA配列(配列番号:1)もしくはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれらDNA配列をもとに合成したプライマーを用いたPCR法等の常法により単離することができる。

たとえば本発明のLTC₄受容体タンパク質を產生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から抽出したmRNAを鑄型としてcDNAを合成し、ベクターに組み込んでcDNAライブラリーとする。

本発明のLTC₄受容体の產生能力を有する細胞あるいは組織としては、例えばヒトの脾臓を用いることができる。

このライブラリーを、配列番号:1に基づいて設定したプローブを使ったコロニーハイブリダイゼーションやプランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングすることにより、目的とするcDNAのクローニングが可能である。

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術(Current Protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987)Publish.Jhon Wiley & Sons Section 6.3-6.4)を用いて配列番号:2からなるタンパク質をコードする塩基配列(配列番号:1)またはその一部をもとにこれと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを得ることは、通常行いうことである。

このように得られたDNAは本発明に含まれる。

As DNA of this invention, protein of this invention it is something which if cord it can do, there is not especially restriction in morphological form, other than and genomic DNA, chemically synthesized DNA etc cDNA are included.

In addition, if cord it can do protein of this invention, DNA which possesses nucleotide sequence of option which is based on degeneracy of genetic code is included.

for example considering codon use frequency of host which is utilized, it can decide this kind of nucleotide sequence, in accordance with conventional method (Crantham,R.et al.(1981) Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD), 9 r43 - r74).

Furthermore, following desired alteration to site specific * mutagenesis (site specific mutation) (Mark,D.F.et al.(1984) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (0027 - 8424), 81 and 5662 - 5666)etc which utilizes primer which consists of synthetic oligonucleotide which the cord is done, it can alter portion of codon of these nucleotide sequence.

Isolates DNA of this invention, is possible DNA sequence which protein which consists of Sequence Number:2 cord is done (Sequence Number:1) or with the PCR method or other conventional method which uses primer which is synthesized on basis of the hybridization method and these DNA sequence which designate part of that as probe.

It synthesizes cDNA with mRNA which is extracted from the human cell or tissue which possesses capacity which produces LTC₄receptor protein quality of for example this invention as template, installs in vector and makes cDNA library.

spleen of for example human can be used as cell or tissue which possesses the producing ability power of LTC₄receptor of this invention.

cloning of cDNA which is made objective by screening doing with colony hybridization and plaque hybridization which used probe which is set this library, on basis of Sequence Number:1, is possible.

In addition, if it is a person skilled in the art, nucleotide sequence which protein which consists of Sequence Number:2 making use of hybridization technology (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish.Jhon Wiley & Sons s tion 6. 3- 6. 4) cord is done (Sequence Number:1) or part of that this and isolating DNA where homology is high on basis of, from said DNA fact that obtaining DNA which identical protein cord is done means usually it can do in protein and functional of this invention.

This way DNA which is acquired is included in this

THIS PAGE BLANK (USPTO)

機能的に同等なタンパク質をコードする遺伝子を単離する生物としては、ヒト以外に、例えばラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションのストリングエンサーは、通常、洗浄条件として「1xSSC、0.1% SDS、37 deg C」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42 deg C」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65 deg C」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同意を有するDNAの単離を期待しうる。

但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリングエンサーを決定する上記若しくは他の要素(例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリングエンサーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される本発明のDNAがコードするタンパク質は、通常、配列番号:2からなるタンパク質とアミノ酸配列において高い相同意を有する。

高い相同意とは、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上の配列の同一性を指す。

あるいは本発明における高い相同意とは、特に望ましくは90%以上、より望ましくは95%、更に望ましくは99%以上の同一性を指す。

相同意の特定は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。

また、遺伝子増幅技術(PCR)(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al.(1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4)を用いて配列番号:2からなるタンパク質をコードするDNA配列(配列番号:1)の一部をもとにプライマーを設計し、配列番号:2からなるタンパク質をコードするDNA配列またはその一部と相同意の高いDNA断片を単離することも可能である。

このようにして得られた、配列番号:1の塩基配列と相同意の高い塩基配列からなるDNAによってコードされるタンパク質について、LTC₄受容体活性を確認し、最終的に本発明によるDNA

invention.

Other than human, you can list for example rat, mouse, rabbit, chicken, pig, bovine etc, cord is done identical protein as organism which isolates gene which in functional, but it is not restricted to these.

stringency of hybridization in order to isolate DNA which identical protein cord is done usually, as washing condition with "1 xSSC, 0.1% SD S, 37 deg C" extent, as a harsher condition with "0.5 xSSC, 0.1% SD S, 42 deg C" extent, with "0.2 xSSC, 0.1% SD S, 65 deg C" extent, extent probe arrangement to which condition of hybridization becomes harsh can expect isolation of DNA which possesses high homology to functional furthermore as harsh condition.

However, if above-mentioned SSC, SD S and combination of condition of temperature in illustration, are person skilled in the art, stringency which is similar to description above description above which decides stringency of hybridization or other element (length, hybridization reaction time etc of for example probe concentration, probe) due to appropriate combination especially, is actualized is possible.

DNA of this invention which is isolated making use of this kind of hybridization technology as for protein which cord is done, has high homology usually, in protein and amino acid sequence which consist of Sequence Number:2.

High homology, it points to identity of arrangement of 60% or more, preferably 70% or more at least.

Or high homology in this invention, especially 95%, furthermore it points to identity of 99% or more desirably more desirably than 90% or more, desirably.

It can decide specific of homology, making use of BLAST search algorithm.

In addition, DNA sequence which protein which designs primer on the basis of, portion of DNA sequence (Sequence Number:1) which protein which consists of Sequence Number:2 making use of gene amplifying technology (PCR) (current protocols in Journal of Molecular Biology (0022 - 2836, JMOBAK) edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) cord is done consists of Sequence Number:2 cord is done or also it is possible to isolate the part of that and DNA fragment where homology is high.

LTC₄ receptor activity can be verified nucleotide sequence where homology is high concerning protein which cord is done with DNA which it acquired consists of nucleotide sequence of Sequence Number:1 and in this way, DNA can

THIS PAGE BLANK (USPTO)

を単離することができる。

LTC₄受容体活性は、cDNAを動物細胞に形質転換してタンパク質に翻訳させ、これを LTC₄受容体に対する抗体や LTC₄の結合を指標としてスクリーニングすることによって確認することができる。

タンパク質の翻訳には、動物細胞のみならず、インビトロトランスレーションを利用することもできる。

本発明はこのようにして単離することができるタンパク質、並びにそれをコードする DNA を含む。

すなわち本発明は、配列番号:17 に示す DNA と、それによってコードされるアミノ酸配列(配列番号:18)からなるブタ由来の LTC₄受容体を提供する。

更に本発明は、配列番号:21 に示す DNA と、それによってコードされるアミノ酸配列(配列番号:22)からなるラット由来の LTC₄受容体を提供する。

その他、一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられている(例えば、Nishi,T. et al.(1985)J.Biochem.,97,153-159 を参照)。

この多型現象によって 1 または複数個のアミノ酸が置換される場合もあれば、スクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

これら多型に基づいて塩基配列に変異を生じた DNA も、本発明の DNA に含まれる。

また、化学合成 DNA は、DNA 合成機(例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer(Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer(Applied Biosystems 社)など)を用いて合成することができる。

DNA の化学的な合成法は、たとえばホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller,M. et al.(1984)Nature,10,105-111) 等として公知である。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターに関する。

本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター

beisolated with finally this invention.

transformation doing cDNA in animal cell, translation doing in protein, this screening it does LTC₄receptor activity, with connection of antibody and LTC₄ for LTC₄receptor as index, you can verify by.

animal cell furthermore, is possible also fact that in-vitro translation isutilized to translation of protein.

this invention protein, which it can isolate in this way and that the cord includes DNA which is done.

Namely this invention, DNA which is shown in Sequence Number:17 and, offers LTC₄receptor of pig derivation which consists of amino acid sequence (Sequence Number:18) which cord is done with that.

Furthermore this invention, DNA which is shown in Sequence Number:21 and, offers LTC₄receptor of rat derivation which consists of amino acid sequence (Sequence Number:22) which cord is done with that:

In addition, generally as for gene of eukaryote as known with the interferon gene etc, it is thought that polymorphism phenomena (polymorphism) is shown, (for example Nishi,T. et al. (1985) Journal of Biochemistry (0021 - 924 X, JOBIAO), you refer to 97,153 - 159).

When amino acid of one or a plurality is substituted with this polymorphism phenomena ; if it is, as for change of nucleotide sequence being, as for amino acid when it does not change completely, it is.

Also DNA which causes mutation in nucleotide sequence on basis ofthese polymorphism, is included in DNA of this invention.

In addition, it can synthesize chemically synthesized DNA, making use of DNA synthesizer (for example Oligo 1000 MD NA Synthesizer (Beckman corporation), or, 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems corporation) etc).

chemical synthetic method of DNA is public knowledge as for example phosphite triester method (Hunkapiller,M. et al. (1984) Nature (London) (0028 - 0836), 10,105 - 111) etc.

In addition, this invention regards vector where DNA of this invention is inserted.

As vector of this invention, if it is something which keeps DNA which is inserted in stability, especially it is not restricted, if E. coli is used for for example host, pBluescriptvector (Stratagene supplied) etc is desirable as the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(Stratagene 社製)などが好ましい。

本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。

発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でタンパク質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター(プロメガ社製)、大腸菌であれば pET ベクター(Invitrogen 社製)などのベクターが知られている。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。

該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr(Subramani,S. et al.(1981)Mol.Cell.Biol.,1,854-864)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF~BOS(Mizushima,S. and Nagata,S.(1990)Nucleic Acids Res.,18,5322)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4(Invitrogen 社)等を示すことができる。

また培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No.AB009864)、生物個体であれば pME18S ベクター (Mol Cell Biol.8:466-472(1988))を用いることもできる。

ベクターへの本発明の DNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる(Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987)Publish.John Wiley & Sons.Section 11.4~11.11)。

また、本発明は、本発明のベクターを保持する形質転換体に関する。

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。

タンパク質を高発現させるための真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、あるいは酵母等の細胞を利用することができます。

具体的には、サルの細胞である COS 細胞 (Gluzman,Y.(1981)Cell,23,175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクター欠損株 (Urlaub,G. and Chasin,L.A.(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77,4216-4220)、

vector for cloning.

When vector is used in objective which produces protein of this invention, especially expression vector is useful.

As expression vector, if it is a vector which reveals protein inside the in vitro、E. coli, inside cultured cell and inside organism solid, especially it is not restricted. If it is a for example in vitro revelation, if pBEST vector (Promega supplied), it is a E. coli, pETvector (Invitrogen supplied) or other vector is known.

As expression vector of vertebrate animal cell, be able to use those which possess the splice site、polyadenylation site and transcriptional termination sequence etc of promoter、RNA which is position of upstream of gene which usually it tries probably to reveal, this may possess replication origin furthermore in accordance with necessary.

As example of said expression vector, pSV2dhfr which possesses early promoter of the SV40 (Subramani,S. et al. (1981) Molecular and Cellular Biology (0270 - 7306, MCEBD4), 1,854 - 864), pEF~BOS which possesses elongation factor promoter of human (Mizushima,S. and Nagata,S. (1990) Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD), 18 and 5322), the pCEEuropean Patent 4 (Invitrogen corporation) etc which possesses cytomegalovirus promoter is shown, it is possible.

In addition if it is a cultured cell, if pME18S-FL3 vector (GenBank access ion No.AB009864), it is a organism solid, it is impossible also to use pME18Svector (Mol Cell (0092 - 8674) Bi ol.8:466~472 (1988)).

As for inserts DNA of this invention to vector is possible with ligase reaction which uses restriction enzyme site with conventional method, (current protocols in Journal of Molecular Biology (0022 - 2836, JMOBAK) edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. section 11.4~11.11).

In addition, this invention regards transformed host which keeps vector of the this invention.

As host cell where vector of this invention is introduced there is notespecially restriction, it can use various host cell according to objective.

vertebrate animal、insect、or yeast or other cell can be utilized in host cell of eukaryote in order high to reveal protein.

COS cell which concretely, is a cell of monkey (Gluzman,Y. (1981) Cell (0092 - 8674), 23,175 - 182) and dihydro folic acid reductase defect strain of Chinese * hamster ovary cell (CHO) (Urlaub,G. and Chasin,L.A. (1980) Proceedings of the

THIS PAGE BLANK (08/10)

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社)等が公知である。

National Academy of Sciences of the United States of America (0027 - 8424), 77, 4216 - 4220), human embryo kidney derivative HEK293 cell and 293 -EBNACell where EBNA-1 gene of Epstein Barr Virus is introduced into same cell (Invitrogen corporation) etcare public knowledge.

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama,K. and Takebe,Y.(1990)Med.Immunol.,20,27-32) 、pEF-BOS(Mizushima,S. and Nagata,S.(1990)Nucleic Acids Res.,18,5322) 、pCDM8(Seed,B.(1987)Nature,329,840-842) 等が挙げられる。

該発現ベクターは DEAE- デキストラン法 (Luthman,H. and Magnusson,G.(1983)Nucleic Acids Res.,11,1295-1308) 、リン酸カルシウム -DNA 井沈殿法 (Graham,F.L. and van der Ed,A.J.(1973)Virology,52,456-457) 、FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いた方法、および電気パスル穿孔法 (Neumann,E. et al.(1982)EMBO J.,1,841-845) 等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo(Sambrook,J. et al.(1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) や pSV2-neo(Southern,P.J. and Berg,P.(1982)J.Mol.Appl.Genet.,1,327-341) 等をコ・トランスクレクションし、G418 耐性のコロニーを選択することにより LTC₄ 受容体を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

あるいは宿主細胞として 293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4(Invitrogen 社)などの発現ベクターを用いて目的とする形質転換細胞を得ることができる。

本発明における望ましい形質転換細胞は、細胞膜に LTC₄ 受容体を生物学的に活性な状態で発現する。

したがってこの形質転換細胞に LTC₄ を作用させると、形質転換細胞には LTC₄ の刺激に対する

As host cell, when case where COS cell is used is listed toexample, to possess SV40 replication origin, autonomous multiplication beingpossible in COS cell, furthermore be able to use those which have the transcriptional promoter, transcription termination signal and RNA splice site as expression vector, for example pME18S, (Maruyama,K. and Takebe,Y. (1990) Med.Imm unol.,20,27-32), pEF-BOS (Mizushima,S. and Nagata,S. (1990) Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD), 18 and 5322), you canlist pCD M8 (Seed,B. (1987) Nature (London) (0028 - 0836), 329,840 - 842) etc.

As for said expression vector DEAE-dextran method (Luthman,H. and Magnusson,G. (1983) Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD), 11, 1295 - 1308), calcium phosphate-DNA coprecipitate method (Graham,F.L. and van der Ed,A.J. (1973) Virology,52,456-457), method of using FuGENE6 (Boeringer Mannheim corporation). It makes COS cell take in, and with electricity pulse boring method (Neumann,E. et al. (1982) EMBO Journal (0261 - 4189, EMJODG), 1,841 - 845) etc it is possible, it can acquire desired transformed cell this way.

In addition, when CHOcell is used as host cell, vector、 for example pRSVneo which canreveal neogene which functions with expression vector, as G418 resistance marker (Sambrook,J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) and pSV2- neo (Southern,P.J. and Berg,P. (1982) J.Mol.Appl. Gene (0378 - 1119, GENED6) t.,1,327-341) etc □ *transfect is done, transformed cell which produces the LTC₄receptor in stability by selecting colony of G418 resistance can beacquired.

Or when it uses 293 -EBNACell as host cell, it possesses replication origin of the Epstein Barr Virus, it can acquire transformed cell which is made objective making use of pCEuropean Patent 4 (Invitrogen corporation) or other expression vector whose self multiplication is possible with 293-EBNACell.

In plasma membrane LTC₄receptor in biological it reveals desirable transformed cell in this invention, with active state.

Therefore in this transformed cell LTC₄ when it operates, response forstimulus of LTC₄ is observed in transformed cell .

THIS PAGE BLANK (USPTO)

る応答が観察される。

このような形質転換細胞は、後に述べる LTC₄受容体の結合活性を修飾する化合物のスクリーニングにも用いることができる。

本発明による形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に本発明の LTC₄受容体が生産される。

該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。

また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

培養によって形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される本発明の LTC₄受容体は、各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。

分離・精製方法としては、例えば LTC₄受容体タンパク質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

なお、膜分画は常法に従って得ることができる。

例えば本発明の LTC₄受容体を表面に発現する細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより必要な膜分画を得られる。

また、できるだけ緩和な可溶化剤(CHAPS、Triton X-100、ジキトニン等)で LTC₄受容体を可溶化することにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

本発明の LTC₄受容体はマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該 LTC₄受容体の発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。

response for stimulus of LTC₄ is observed in transformed cell.

You can use this kind of transformed cell, for also screening of compound which decorates binding activity of LTC₄receptor which is expressed afterwards.

Cultures transformed host, with this invention in accordance with conventional method to be possible; LTC₄receptor of this invention is produced to the intracellular or cell surface by said culture.

Appropriately be able to select various ones which common use are done, if it is a for example above-mentioned COS cell, those which add the fetal calf serum (FBS) or other blood serum component according to need for RPMI-1640 medium and Dulbecco correction Eagle minimum essential medium (DMEM) or other medium can be used according to host cell which is adopted as medium which is used for said culture.

In addition, if description above 293 -EBNA cell is, those which add the G418 to Dulbecco correction Eagle minimum essential medium (DMEM) or other medium which adds fetal calf serum (FBS) or other blood serum component can be used.

LTC₄receptor of this invention which is produced to intracellular or cell surface of transformed host with culture separation and purification is possible with various publicly known separation operation methods.

As isolation and purification method, solubilizing after doing membrane fraction which includes for example LTC₄receptor protein quality, can be treated with conventional protein precipitation agent, ultrafiltration, molecule sieve chromatography (gel filtration), these combinations etc of adsorption chromatography, ion exchanger chromatography, affinity chromatography, high-performance liquid chromatography (HPLC) or other various liquid chromatography, dialysis, can be illustrated.

Furthermore, following to conventional method, it can acquire membrane fraction.

It cultures cell which reveals LTC₄receptor of for example this invention in the surface, after suspension, homogenizing does these in buffer and it is acquired necessary membrane fraction by centrifugal separation doing.

In addition, also rear of solubilizing can keep characteristic of the receptor by solubilizing doing LTC₄receptor as much as possible with relaxing solubilizer (CHAPS, Triton X-100, di キ jp7 ニン etc).

As for LTC₄receptor of this invention fusing with marker sequence, and in-frame by fact that it reveals, verification, intracellular localized verification and refining etc of revelation of said LTC₄receptor become possible.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitopeなどがある。

また、マーカー配列とLTC₄受容体の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体とHexa-Histidine tagとをトロンビン認識配列で連結した報告がある (Hayashi,M.K. and Haga,T.(1996)J.Biochem.,120,1232-1238)

また、本発明は、配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAに関する。

本発明のDNAと「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは厳格な条件下で、本発明のDNAとハイブリダイズし、他のDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。

このようなDNAは、本発明のDNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のDNAを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。

プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは15bp~40bpの鎖長を有する。

プライマーとして好ましい塩基配列を、配列番号:7(フォワードプライマー)および配列番号:8(リバースプライマー)に示した。

また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列(またはその相補配列)を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。

本発明に基づくプローブやプライマーは、機能障害と関連したLTC₄受容体遺伝子の変異型の検出に利用することができる。

欠失および挿入変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出できる。

点突然変異は増幅DNAを標識LTC₄受容体ヌクレオチドとハイブリダイズさせることで同定できる。

完全にマッチした配列とミスマッチの二重鎖とはRNアーゼ消化により、または融解温度の差異

As marker sequence, there is a for example FLAG epitope, Hexa-His tidine tag, Hemagglutinin tag, myc epitope etc.

In addition, marker sequence part it is possible by inserting specific sequence which en terrorist kinase, factor Xa, thrombin or other protease recognizes between marker sequence and the LTC₄receptor, to cut off to remove with these protease .

There is report which connects for example muscarinic acetyl choline receptor and Hexa-His tidine tag with thrombin recognition sequence (Hayashi,M.K. and Haga,T. (1996) Journal of Biochemistry (0021 - 924 X, JOBIAO), 120 and 123 2 - 1238)

In addition, hybridize it does this invention, in DNA, and specific which consist of nucleotide sequence which is stated in Sequence Number:1 it regards the DNA which at least possesses chain length of 15 nucleotide.

DNA of this invention "In specific hybridize it does" with, under conventional hybridization condition and under preferably strict condition, DNA and hybridize of this invention it does, hybridize does not do other DNA it means .

As for this kind of DNA, it detects and as probe in order toisolate DNA of this invention, in addition, it utilizes it ispossible as primer in order amplifying to do DNA of this invention.

When it uses, as primer of usually, it possesses chain length 15 bp~100 bp, preferably 15 bp~40 bp.

Desirable nucleotide sequence, Sequence Number:7 (forward primer) and was shown in Sequence Number:8 (reverse primer) as the primer.

In addition, when it uses, as probe DNA of this invention itpossesses arrangement (Or complementary sequence) of part or all at least, can use DNA of chain length of 15 bp at least.

It can utilize probe and primer which are based on this invention,in detection of mutant type of LTC₄receptor gene which it is related with the dysfunction.

When comparing with normal genotype, it can detect deficiency and insertion mutation,with change of size of amplification product.

point spontaneous mutation labelling LTC₄receptor nucleotide and identification can do amplifying DNA by fact that hybridize it does.

You can distinguish it is informed completely arrangement and dual chain of mismatch which match are done with

THIS PAGE BLANK (USPTO)

により区別できることが知られている。

また DNA 配列の差異は、配列を比較すべき領域の塩基配列を決定することによって検出することができる。

あるいは、ゲルに含まれる変性剤の有無による DNA 断片の電気泳動の移動度の変化により検出する方法も公知である (Myers,R.M.et al.(1985)Science.230,1242-1246)。

特定位置での配列変化はスクレアーゼプロテクションアッセイ(例えば、RN アーゼおよび S1 プロテクション)または化学的開裂法によっても確認できること(Cotton et al.(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:4397-4401)。

本発明に基づいて、LTC₄ 受容体の塩基配列またはその断片を含むオリゴスクレオチドプローブのアレイを構築することができる。

アレイ技法は公知で、遺伝子発現、遺伝的連鎖および遺伝的変異性を解析するために用いられる て い る (Chee,M.et al.(1996)Science.,274,610-613)。

さらに、被験者から得られたサンプルからの LTC₄ 受容体のレベルの異常な低下または増加を測定することにより、LTC₄ 受容体の過少発現、過剰発現または変化した発現により生ずる疾患またはその罹病性の診断に利用される。

発現の低下または増加は、当業者で公知のポリスクレオチド定量法のいずれか、例えば PCR、RT-PCR、RN アーゼプロテクション、ノーザンプロット、その他のハイブリダイゼーション法により RNA レベルで測定することができる。

これらの DNA に基づく診断のための試料は、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料から得ることができる。

また、「配列番号:1に記載の DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有する DNA」には、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのアンチセンス DNA が含まれる。

アンチセンス DNA は、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp、さらに好ましくは 500bp 以上の鎖長を有し、通常、3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内の鎖長を有する。

このようなアンチセンス DNA には、本発明のタンパク質の異常(機能異常や発現異常)などに

RNase digestion, or by difference of melting temperature.

In addition it can detect difference of DNA sequence, nucleotide sequence of the domain which should compare arrangement is decided with.

Or, also method which is detected with change of mobility of electrophoresis of DNA fragment is public knowledge with presence or absence of modification agent which is included in gel, (Myers,R.M.et al. (1985) Science.230,124 2- 1246).

nuclease protection assay (for example RNase and S1 protection) or you can verify arrangement change with special constant position even with chemical cleavage method (Cottone et al. (1985) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (0027 - 8424) 85: 4397 - 4401).

On basis of this invention, array of oligonucleotide probe which includes the nucleotide sequence or fragment of LTC₄ receptor can be constructed.

array technique with public knowledge, is used in order to analyze gene expression, genetic linkage and genetic mutation characteristic, (Chee,M.et al. (1996) Science.,274,610-613).

Furthermore, disease which it occurs due to revelation which changes by measuring abnormal decrease or increase of level of LTC₄ receptor from sample which is acquired from subject, too little revelation and overexpression of LTC₄ receptor or it is utilized in the contraction characteristic diagnosis.

With person skilled in the art it can measure decrease or increase of revelation, with RNA level any, for example PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blot, other hybridization method of polynucleotide quantification method of public knowledge due to.

It can acquire specimen for diagnosis which is based on these DNA, from biopsy or autopsy material of cell, for example blood, urine, saliva, organization of subject.

In addition, antisense DNA in order to control revelation of protein of this invention is included in "DNA which hybridize it does in DNA, and specific which are stated in Sequence Number:1 at least possesses chain length of 15 nucleotide".

antisense DNA, in order to cause antisense effect, 15 bp or more, preferably 100 bp, furthermore has chain length above preferably 500 bp at least, usually, possesses chain length within 3000 bp and within preferably 2000 bp.

Also application to genetic therapeutic of disease which originates in the fault (functional abnormality and expressed

THIS PAGE BLANK (USPTO)

起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。

該アンチセンス DNA は、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA(例えば、配列番号:1に記載の DNA)の配列情報を基にホスホロチオエート法(Stein,1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides.Nucleic Acids Res 16,3209-21(1988))などにより調製することが可能である。

本発明によるアンチセンス DNA を用いて LTC₄受容体遺伝子をノックアウトすることにより、LTC₄受容体が関与する疾患の解明を進めることができる。

本発明の DNA またはアンチセンス DNA は、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクター やリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo 法や in vivo 法などにより患者へ投与を行う。

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体に関する。

本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。

また、全てのクラスの抗体が含まれる。

さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の LTC₄受容体に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、は各種動物に該 LTC₄受容体やその断片を直接投与することで得ることができる。

また、本発明の LTC₄受容体をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz,E.et al.(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91,9519-9523;Donnelly,J.J.et al.(1996)J.Infect.Dis.,173,314-320) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は、LTC₄受容体タンパク質またはその断片をフロント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。

abnormality) etc of protein of this invention is thought in this kind of antisense DNA .

Manufacture said antisense DNA, is possible on basis of sequence information of DNA (DNA which is stated in for example Sequence Number:1) which protein of for example this invention cord is done with phosphoro thionate method (Stein,1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligode oxynucleotide s.Nucleic Acids Res 16,3209-21 (1988)) etc:

Elucidation of disease where LTC₄receptor participates by knock-out doing LTC₄receptor gene making use of antisense DNA, is advanced with this invention ,it is possible .

DNA or antisense DNA of this invention, when it uses for genetic therapeutic, the for example retrovirus vector and adenoviridae vector, making use of adeno attendance viral vector or other viral vector and liposome or other non- viral vector etc, prescribes to patient with ex vivo method and in vivo method etc.

In addition, this invention regards antibody which is connected to the protein of this invention.

There is not especially restriction in morphological form of antibody of the this invention, polyclonal antibody and also those parts which possess monoclonal antibody or antigen bonding ability are included.

In addition, antibody of all class is included.

Furthermore, also humanized antibody or other special antibody is included in antibody of this invention.

It can acquire antibody、for example polyclonal antibody、monoclonal antibody、which reacts to LTC₄receptor of this invention by the fact that said LTC₄receptor and fragment are prescribed to various animal directly.

In addition, it can acquire even with DNA vaccine method (Raz,E.et al. (1994) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (0027 - 8424), 91, 9519 - 9523; Donnelly,J.J.et al. (1996) J. Infect.Dis.,173, 314- 320) making use of plasmid which introduces gene which LTC₄receptor of this invention cord is done.

LTC₄receptor protein quality or fragment emulsion it does polyclonal antibody, in the Freund complete adjuvant or other suitable adjuvant, immunity does in abdominal cavity, subcutaneous and and vein etc it is produced from animal, for example rabbit、rat、goat、or chicken or other blood serum or egg which sensitization are done.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

このように製造された血清または卵から、常法のタンパク質単離精製法によりポリクローナル抗体を分離精製することができる。

ポリクローナル抗体の分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルス泰因の細胞融合法 (Kohler,G. and Milstein,C.(1975)Nature,256,495-497) により当業者が容易に製造することが可能である。

本発明の LTC₄ 受容体またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。

最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチングアニーホスホリボシリトランスクフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8.1U1、を利用する。

また、融合剤としてはポリエチレンギリコールを利用する。

さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、RPH-1640 などの通常よく用いられているものに適宜 10~30%の牛胎児血清を加えて用いる。

融合株は HAT 選択法により選択する。

ハイブリドーマの培養上清を ELISA 法や免疫組織染色法などの周知の方法によってスクリーニングし、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローニングを選択する。

また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローニング性を保証する。

このようにして得られるハイブリドーマは培地中で 2~4 日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c 系マウスの腹腔内で 10~20 日培養することで精製可能な量の抗体が產生される。

あるいは、ハイブリドーマを前記のような培地中

This way separation and purification is possible polyclonal antibody from blood serum or egg which is produced, with protein isolation and purification method of conventional method.

As separation and purification method of polyclonal antibody, with for example centrifugal separation, dialysis, ammonium sulfate you can list chromatography with such as salt precipitation, DEAE-cellulose, hydroxyapatite, protein Aagarose.

person skilled in the art produces monoclonal antibody, is possible easily with the cell fusion method (Kohler,G. and Milstein,C. (1975) Nature (London) (0028 - 0836), 256,495 - 497) of Kohler and Milstein.

immunity it does LTC₄ receptor or fragment of this invention in Freund complete adjuvant or other suitable adjuvant the emulsion which emulsion is done in every several weeks by several times repeating inoculation doing in abdominal cavity, subcutaneous or vein of mouse.

After final immunity, it removes spleen cell, fuses with myeloma cell and produces hybridoma.

myeloma cell, for example mouse myeloma cell line P3X63 Ag 8.U1, which has marker a hypoxanthine—guanine—phosphoribosyl transferase defect and like the thymidine kinase defect as myeloma cell in order to obtain hybridoma, is utilized.

In addition, polyethylene glycol is utilized as molten compound.

It uses for those which Eagle person minimum essential medium, Dulbecco person modified method minimum essential medium, RPH I-1640 or other usually are well used including as needed 10 - 30% fetal calf serum furthermore as medium in hybridoma producing.

Fusion strain selects due to HAT choice method.

culture supernatant of hybridoma screening is done with ELISA method and immunohistological staining method or other widely known method, clone of hybridoma which the antibody of objective secretion has been done is selected.

In addition, with limiting dilution method, single clone characteristic of hybridoma is guaranteed by repeating subcloning.

hybridoma which is acquired in this way in medium with 2 - 4 day, or Pristan 10 - 20 days antibody of purifiable quantity is produced by fact that it cultures with intraperitoneal of BALB/c mouse which preprocessing is done.

Or, aforementioned way also to culture in medium it is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

で培養することもできる。

腹水や培養上清中に產生されるモノクローナル抗体は、常法のタンパク質単離精製法により分離精製することができる。

そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

また、モノクローナル抗体またはその一部分を含む抗体断片は、該抗体をコードする遺伝子の全部または一部を発現ベクターに組み込み、大腸菌、酵母、または動物細胞に導入して生産させることもできる。

更には、本発明の LTC₄受容体に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデーの方法(Clackson,T.et al.(1991)Nature,352,624-628;Zebedee,S.et al.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89,3175-3179)により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。

また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス(Lonberg,N.et al.(1994)Nature,368,856-859)に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる(Methods in Enzymology 203,99-121(1991))。

本発明によるポリクローナル抗体やモノクローナル抗体からは、常法により、ペプシン、パパイン等のタンパク質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法のタンパク質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')₂、Fab、Fab'、あるいはFvを得ることができる。

本発明のタンパク質に結合する抗体は、本発明のタンパク質の精製に加え、例えば、本発明のタンパク質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。

具体的には、例えば組織、血液、または細胞などからタンパク質を抽出し、ウエスタンプロット法、競合結合アッセイ、免疫沈降、ELISA 等の方法による本発明のタンパク質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断する

possible hybridoma.

spleen and monoclonal antibody which is produced in culture supernatant separation and purification is possible with protein isolation and purification method of conventional method.

With for example centrifugal separation、 dialysis、 ammonium sulfate you can list chromatography with such as salt precipitation、 DEAE-cellulose、 hydroxyapatite、 protein Aagarose as that kind of method.

In addition, monoclonal antibody or antibody fragment which includes portion, it installs all or part of gene which said antibody cord is done in expression vector, introduces into E. coli、 yeast、 or animal cell and it is possible also to produce.

Furthermore, also it is possible to be possible Klaxon and others and ゼベデー with method (Clackson,T.et al. (1991) Nature (London) (0028 - 0836), 352,624 - 628; Zebedee,S.et al. (1992) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (0027 - 8424), 89 and 31 75 -31 79) of テ and others antibody which reacts to LTC₄receptor of this invention, as single chain Fv and Fab.

In addition, also it is possible in transgenic mouse (Lonberg,N.et al. (1994) Nature (London) (0028 - 0836), 368,856 - 859) which replaces the antibody gene of mouse to human antibody gene to obtain human antibody by fact that immunity it does.

In addition, it can manufacture humanized antibody, with genetic recombination which uses hypervariable region of monoclonal antibody (Methods in Enzymology (0076 - 6879) 203, 99 - 121 (1991)).

With this invention from polyclonal antibody and monoclonal antibody, digestion is done with pepsin、 papain or other protease with conventional method, by fact that separation and purification it does, the antibody fragment、 for example F which includes portion of antibody which has activity (ab')₂、 Fab、 Fab'、 or Fv can be acquired with protein isolation and purification method of conventional method continuously.

antibody which is connected to protein of this invention can think also expressed abnormality of protein of for example this invention and that it utilizes in the inspection *diagnosis of structure fault in addition to refining protein of this invention.

Concretely, it extracts protein from for example organization、 blood、, or cell etc the inspection *diagnosis it is possible presence or absence of fault of revelation and structure with Western blot method、 competitive binding assay、 immunoprecipitation、 ELISA or other method through

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ことができる。

また、本発明のタンパク質に結合する抗体を、本発明のタンパク質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。

抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。

本発明は、本発明のタンパク質を利用した、被験化合物の LTC₄ 受容体活性を検出する方法、並びにこの検出方法に基づいて LTC₄ 受容体活性を修飾する化合物をスクリーニングする方法に関する。

本発明の検出方法は、本発明のタンパク質と被験化合物とを接触させ、本発明のタンパク質の LTC₄ 受容体活性の変化を測定する工程を含む。

更にこの検出方法を利用して、LTC₄ 受容体活性を修飾する物質を選択することにより本発明のスクリーニング方法を実施することができる。

「LTC₄ 受容体活性を修飾する」とは、単独で本発明の LTC₄ 受容体に結合し、シグナルを伝達すること、または LTC₄ と競合し、LTC₄ によるシグナル伝達を阻害することを言う。

本発明の検出方法において、LTC₄ 受容体活性の変化は、スクリーニングに用いる LTC₄ 受容体タンパク質の生理学的な特性に応じた活性の指標を測定することにより行われる。

指標とする活性とは、たとえばリガンドとの結合活性であり、あるいはリガンドの結合によってもたらされる刺激に対する応答である。

具体的には、以下に述べるような検出方法を示すことができる。

また本発明によるスクリーニング方法のための被験化合物としては、例えば次のような化合物を用いることができるが、これらの化合物に限定されること無く、あらゆる化合物を被験化合物とすることができます。

detection of protein of this invention.

In addition, it is thought that it utilizes in treatment or other objective of disease which is related antibody which is connected to protein of the this invention, to protein of this invention.

When antibody is used with treatment objective of patient, it is desirable in point where human antibody or humanized antibody immunogenicity is little.

Method this invention utilizing protein of this invention, detecting the LTC₄ receptor activity of compound being tested. It regards method which compound which decorates LTC₄ receptor activity and on basis of this detection method screening is done.

detection method of this invention, protein and compound being tested of this invention contacting, includes step which measures change of LTC₄ receptor activity of protein of this invention.

Furthermore making use of this detection method, screening method of this invention can be executed by selecting substance which decorates LTC₄ receptor activity.

"LTC₄ receptor activity is decorated "With, it connects to LTC₄ receptor of this invention with alone, transmits signal, or it competes with LTC₄, inhibition does the signal transduction with LTC₄ you say .

In detection method of this invention, change of LTC₄ receptor activity is done by measuring index of activity which responds to physiological characteristic of LTC₄ receptor protein quality which is used for screening.

activity which is made index, with binding activity of for example ligand, or is the response for stimulus which is brought with connection of the ligand.

Kind of detection method which concretely, is expressed below is shown, it is possible.

In addition for example next kind of compound can be used as compound being tested for screening method, all compound can be designated as compound being tested with this invention, but without being limited in these compound.

ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物ペプチド

various known compound peptide which is registered to chemical file

LTC4受容体に	対する抗体			
To LTC4 receptor	antibody which confronts			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I.(1995)Tetrahedron,51,8135-8137)によって得られた化合物群

ファージ・ディスプレイ法 (Felici,F.,et al.(1991)J.Mol.Biol.,222,301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群

微生物の培養上清

植物や海洋生物由来の天然成分

動物組織抽出物

あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチド

統いて、代表的なスクリーニング方法について具体的に説明する。

a)リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明の LTC_4 受容体に結合する化合物は、リガンド結合アッセイ法によりスクリーニングすることができる。

まず LTC_4 受容体タンパク質を発現させた細胞膜、あるいは LTC_4 受容体タンパク質精製標品を調製する。

緩衝液、イオン、pHのようなアッセイ条件を最適化したバッファー中で、 LTC_4 受容体タンパク質を発現させた細胞膜、あるいは LTC_4 受容体タンパク質精製標品を、標識リガンドとともに被験化合物と共に一定時間インキュベーションする。

標識リガンドには、例えば [3H] LTC_4 を用いることができる。

反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。

被験化合物存在下における標識リガンドの特異的結合の阻害を指標に、 LTC_4 受容体に拮抗する化合物をスクリーニングすることができる。

たとえば、実施例 4 記載のリガンド結合アッセイ条件下で、 [3H] LTC_4 とともに被験化合物を一定時間インキュベーションしたときの IC50 が $10\mu M$ 以下の物質を、更に好ましくは IC50 が $1\mu M$ 以下の物質を選択することができる。

b)GTP γ S 結合法を利用したスクリーニング方法

本発明の LTC_4 受容体の活性を修飾する化合物は、GTP γ S 結合法によりスクリーニングすることが可能

I. (1995) Tetrahedron (0040 - 4020, TETRAB), 51, 8135 - 8137) with group of compounds which is acquired

Applying phage * display method (Fe lici,F.,et al. (1991) Journal of Molecular Biology (0022 - 2836, JMOBAK), 222,301 - 310), etc was drawn up random * peptide group which

culture supernatant of microorganism

natural component of plant and marine organism derivation animal tissue extract thing

Or compound or peptide which is selected by screening method of this invention compound or peptide which is decorated in chemical or biological

Consequently, you explain concretely concerning representative screening method.

screening method which utilizes a) ligand binding assay method

compound which is connected to LTC_4 receptor of this invention screening is possible with ligand binding assay method.

First plasma membrane、or LTC_4 receptor protein quality purified standard which reveals LTC_4 receptor protein quality is manufactured.

In buffer which assay condition like buffer、ion、pH optimization is done, the plasma membrane、or LTC_4 receptor protein quality purified standard which reveals LTC_4 receptor protein quality is done, with labelling ligand with compound being tested constant time incubation.

for example [3H] LTC_4 can be used to labelling ligand .

After reacting, it filters with glass filter and etc after washing with buffer of suitable amount, it measures radioactivity which remains in the filter with liquid scintillation counter etc.

inhibition of specific binding of labelling ligand in under compound being tested existing compound which competes to LTC_4 receptor screening is possible to index.

When under ligand binding assay condition which is stated in for example Working Example 4 , with [3H] LTC_4 constant time incubation doing compound being tested, IC 50 substance of $10\mu M$ or less, furthermore preferably IC 50 can select substance of $1\mu M$ or less.

screening method which utilizes b) GTP;ga S bonding method

screening it does compound which decorates activity of LTC_4 receptor of this invention, with GTP;ga S bonding.

THIS PAGE BLANK (USPS)

で あ る (Lazareno,S.and Birdsall,N.J.M.(1993)Br.J.Pharmacol.109,1120-1127)。

LTC₄ 受容体を発現させた細胞膜を 20mM HEPES(pH7.4), 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 50mM GDP 溶液中で、³⁵S で標識された GTP^γS 400pM と混合する。

被験化合物存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合した GTP^γS の放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。

被験化合物存在下における特異的な GTP^γS 結合の上昇を指標に、該 LTC₄ 受容体のアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。

また、被験薬存在下における、LTC₄ または LTD₄ による GTP^γS 結合上昇の抑制を指標に LTC₄ 受容体のアンタゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。

c)細胞内 Ca⁺⁺および cAMP 濃度の変動を利用したスクリーニング方法 本発明の LTC₄ 受容体の活性を修飾する化合物は、LTC₄ 受容体を発現させた細胞の細胞内 Ca⁺⁺または cAMP 濃度の変動を利用してスクリーニングすることができる。

Ca⁺⁺濃度の測定は fura2, fluo3 等を用い、また cAMP 濃度の測定は市販の cAMP 測定キット (Amersham 社等)を用いて測定できる。

その他 Ca⁺⁺および cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより、間接的に Ca⁺⁺および cAMP 濃度を測定することもできる。

LTC₄ 受容体を発現させた細胞と受容体を発現させていない宿主細胞(コントロール細胞)に被験化合物を一定時間作用させ、Ca⁺⁺および cAMP 濃度を直接あるいは間接的に測定する。

コントロール細胞と比較して、LTC₄ 受容体を発現させた細胞特異的な Ca⁺⁺の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下を指標にアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。

また、被験化合物存在下における、LTC₄ または LTD₄ による Ca⁺⁺の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下の阻害作用を指標に該 LTC₄ 受容体のアンタゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。

method it is possible, (Lazareno,S. and Birdsall,N.J.M. (1993) British Journal of Pharmacology (0007 - 1188, BJPCB) 109, 1120 - 1127).

plasma membrane which reveals LTC₄receptor 20 mM HEPES (pH 7.4), in 100 mM NaCl, 10 mM Mg Cl₂, 50 mM GDP solution, is mixed with GTP;ga S 400pM which labelling is done with ³⁵S.

Under compound being tested existing and under absence after incubation, it filters with glass filter, etc it measures radioactivity of GTP;ga S which is connected with liquid scintillation counter etc.

Rise of specific GTP;ga S connection in under compound being tested existing the compound which possesses agonist activity of said LTC₄receptor screening is possible to index.

In addition, in under test chemical existing, control of GTP;ga S connection rise screening is possible compound which possesses the antagonist activity of LTC₄receptor in index with LTC₄ or LTD₄.

screening it does compound which decorates activity of LTC₄receptor of screening method this invention which utilizes fluctuation of c) intracellular Ca⁺⁺ and cAMP concentration, making use of intracellular Ca⁺⁺ of cell which reveals LTC₄receptor or the fluctuation of cAMP concentration it is possible.

Making use of fura2, fluo3 etc, in addition measurement of cAMP concentration can measure measurement of Ca⁺⁺ concentration making use of commercial cAMP assay kit (Amersham corporation etc).

In addition depending on Ca⁺⁺ and cAMP concentration, it is possible also to measure Ca⁺⁺ and cAMP concentration in indirect by detecting the copying activity of gene where transferred amount adjusts.

compound being tested constant time operating in host cell (Control cell) which does not reveal cell and receptor which reveal LTC₄receptor, directly or it measures Ca⁺⁺ and cAMP concentration in indirect.

By comparison with control cell, rise or decrease of rise and/or cAMP concentration of cell specific Ca⁺⁺ which reveals LTC₄receptor screening is possible the compound which possesses agonist activity in index.

In addition, in under compound being tested existing, inhibition of rise or decrease of rise and/or cAMP concentration of Ca⁺⁺ screening is possible compound which possesses antagonist activity of said LTC₄receptor in index with LTC₄ or LTD₄.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

本発明のスクリーニング方法において選択すべきアンタゴニスト活性を有する化合物とは、本発明の LTC_4 受容体に対してリガンドである LTC_4 または LTD_4 と競合し、かつ LTC_4 受容体に結合したときにシグナルの伝達を伴わない化合物と定義することができる。

アンタゴニストの本発明による LTC_4 受容体に対する親和性は制限されないが、IC₅₀ が $10\mu M$ 以下、特に $1\mu M$ 以下の化合物が望ましい。

本明細書においては、アンタゴニストは、遮断剤、あるいは拮抗剤と同義の用語として用いられる。

たとえば、実施例 5 記載の条件で、被験化合物を一定時間作用させ LTC_4 または LTD_4 による細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇の阻害を指標にその IC₅₀ が $10\mu M$ 以下の物質を、更に好ましくは IC₅₀ が $1\mu M$ 以下の物質をアンタゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

これらのスクリーニングにより単離される LTC_4 受容体タンパク質の活性を修飾する化合物を主成分として、 LTC_4 受容体を標的とする医薬を得ることができる。

例えば実施例において選択された化合物 A(N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-6-(1-propyl-1H-benzimidazol-2-yl)-1-naphthalenesulfonamide) は、IC₅₀= $1.2\mu M$ を有する、本発明の LTC_4 受容体タンパク質に対するアンタゴニストである。

化合物 A は、 LTC_4 受容体と LTC_4 の結合を用量依存的に阻害する。

更に化合物 A は、本発明の LTC_4 受容体タンパク質の細胞遊走活性や、冠動脈平滑筋細胞の LTC_4 に対する応答を用量依存的に阻害する。

これらの事実から、本発明のスクリーニング方法によって、本発明の LTC_4 受容体タンパク質のアンタゴニストを選択できることが明らかである。

本発明の LTC_4 受容体タンパク質のアンタゴニストは、 LTC_4 受容体を標的とする医薬として有用である。

Regarding to screening method of this invention, compound which possesses the antagonist activity which it should select, it can compete with LTC_4 or the LTD_4 which is a ligand vis-a-vis LTC_4 receptor of this invention at sametime when connecting to LTC_4 receptor, compound which does not accompany transmission of signal it can define.

affinity for LTC_4 receptor with this invention of antagonist is not restricted. IC 50 compound of $10\mu M$ or less, especially $1\mu M$ or less is desirable.

Regarding this specification, antagonist is used as shielding agent, or antagonist and synonymous term.

With condition which is stated in for example Working Example 5, compound being tested constant time operating, with LTC_4 or LTD_4 inhibition of rise of intracellular Ca^{++} concentration IC 50 substance of $10\mu M$ or less, furthermore preferably IC 50 can select substance of $1\mu M$ or less in index as substance which possesses the antagonist activity.

Medicine which designates LTC_4 receptor as target with compound which decorates activity of LTC_4 receptor protein quality which is isolated by these screening as main component, can be acquired.

選択された化合物

compound A (N-(3 and 4-dimethyl-5-isoxazolyl)-6-(1-propyl-1H-benzimidazol-2-yl)-1-naphthalene sulfonamide) which is selected in for example Working Example has IC 50= $1.2\mu M$, it is a antagonist for LTC_4 receptor protein quality of this invention.

compound A connects LTC_4 receptor and LTC_4 in dose dependent inhibition.

Furthermore cell chemotactic activity of LTC_4 receptor protein quality of this invention and response for LTC_4 of coronary artery smooth muscle cell inhibition it does compound A, in dose dependent.

From these facts, with screening method of this invention, antagonist of LTC_4 receptor protein quality of this invention can be selected is clear.

antagonist of LTC_4 receptor protein quality of this invention is useful as medicine which designates LTC_4 receptor as target.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

本発明の LTC₄ 受容体タンパク質の活性を修飾する化合物を有効成分とする医薬製剤は、有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。

特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望ましい。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。

組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてよい。

錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。

該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。

水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。

非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはブロピレンギリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80 等を含む。

該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含

As for medicine formulation which designates compound which decorates activity of LTC₄receptor protein quality of this invention as active ingredient, it can be manufactured making use of support or vehicle, other additive which, are usually used for those formulating according to type of active ingredient.

Dosage is listed parenteral administration with such as oral dosage, or intravenous injection, intramuscular injection or other injectable, suppository, percutaneous administration agent, transmucosal dosage agent with such as liquid for tablets, pill, capsules, granule, fine granule, powder, oral.

Especially with stomach there being a peptide which digestion is done, intravenous injection or other parenteral administration is desirable.

As for solid composition for oral dosage, active substance of one or a plurality inert diluent, for example lactose, mannitol, fructose, microcrystalline cellulose, hydroxypropyl cellulose, starch, polyvinyl pyrrolidone, magnesium metasilicate aluminate etc of at least one is mixed with this invention.

composition following to conventional method, may contain additive, for example lubricant, disintegrator, stabilizer, dissolving to solubilizer etc other than inert diluent.

tablets and pill sheath have been allowed to have done with glycocalyx or stomach-soluble or enterically soluble substance or other film in accordance with necessary.

As for liquid composition for oral, emulsifier, solution medicine, including the suspension, syrup, elixir, it includes inert diluent, for example purified water, ethanol which is used generally.

said composition may contain additive, for example wetting agent, suspension, sweetener, fragrance, antiseptic other than inert diluent.

As injectable for parenteral, solution medicine of aqueous or nonaqueous of the sterile, suspension, emulsifier is included.

saline etc for for example injectable distilled water, menses is included in water soluble solution medicine and the suspension, as diluent.

alcohols, polysorbate 80 etc like vegetable oil, ethanol like propylene glycol, polyethylene glycol, olive oil water insoluble solution medicine and as diluent of suspension are included.

said composition furthermore may include wetting agent, emulsifier, dispersant, stabilizer, dissolving to

THIS PAGE BLANK (NAP18)

んでいてもよい。

組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通して濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。

また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

本発明による医薬の投与量は、前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

例えば経口投与の場合、その投与量は、通常、成人(体重 60kg として)において、1 日につき約 0.1~100mg、好ましくは 0.1~50mg である。

また非経口投与の場合、注射剤の形では 1 日につき 0.01~50mg、好ましくは 0.01~10mg である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1.オリゴキャップ法による cDNA ライブライマーの作製

ヒト胎盤組織(PLACE1)より、文献(J.Sambrook, E.F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)記載の方法により mRNA を抽出した。

さらに、オリゴ dT セルロースで poly(A)+RNA を精製した。

poly(A)+RNA よりオリゴキャップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]により cDNA ライブライマーを作成した。

Oligo-cap linker(配列番号:3)およびオリゴ dT プライマー(配列番号:4)を用いて文献[鈴木・菅野、タンパク質核酸酵素, 41:197-201(1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156(1997)]の記載にしたがって BAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)処理、TAP(Tobacco Acid Phosphatase)処理、RNA ライゲーション、第一鎖 cDNA の合成と RNA の除去を行った。

次いで、5'(配列番号:5)と 3'(配列番号:6)の PCR プライマーを用い PCR(polymerase chain reaction)により 2 本鎖 cDNA に変換し、SfiI 切断した。

solubilizer、antiseptic etc.

composition sterilization is done with filtration, combination or the lighting which of microbicide pass through for example bacteria trapping filter.

In addition, it produces solid composition of sterile, it melts injectable media for sterile water other sterile at time of use and can also use.

dose of medicine considering strength of activity of the active ingredient which is selected by aforementioned screening method and age, gender etc of disease, administration object, is decided appropriately with this invention.

In case of for example oral dosage, dose is per day approximately 0.1 - 100 mg, preferably 0.1~50 mg usually, in adult (weight 60 kg doing).

In addition in case of parenteral administration, in form of injectable it is a per day 0.01~50 mg, preferably 0.01~10 mg.

preferred embodiment in order to execute invention

Next, this invention furthermore is explained concretely with Working Example, but this invention is not something which is limited in below-mentioned Working Example.

With Working Example 1. oligo cap method production of cDNA library

mRNA was extracted human placenta organization (PLACE 1) from, with method which is stated in literature (J.Sambrook, E.F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning second edition, cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Furthermore, poly (A) +RNA was refined with oligo dT cellulose.

cDNA library was drawn up poly (A) from +RNA with oligo cap method [M. Maruyama and S. Sugano, Gene (0378 - 1119, GENED6), 138: 171 - 174 (1994)].

Following to statement of literature [Suzuki * Sugano, protein nucleic acid enzyme, 41:197-201 (1996), Y. Suzuki et al., Gene (0378 - 1119, GENED6), 200: 149 - 156 (1997)] Oligo-cap linker (Sequence Number:3) and making use of oligo dT primer (Sequence Number:4), it did BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) treatment, TAP (Tobacco Acid Phosphatase) treatment, the synthesis of RNA ligation, first chain cDNA and removal of RNA.

Next, 5' (Sequence Number:5) with making use of PCR primer of 3' (Sequence Number:6) it converted to double strand cDNA with PCR (polymerase chain reaction), SfiI cut off.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

次いで、Dralll で切断したベクター pME18SFL3(GenBank AB009864; Expression vector)に cDNA の方向性を決めてクローニングし、cDNA ライブライアリを作成した。

これらより得たクローニングのプラスミド DNA について、挿入 cDNA サイズが 1kb 以下のクローニングを除いた後、cDNA の 5' 端と 3' 端の塩基配列を DNA シーケンシング試薬(Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit または BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems 社製)を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNA シーケンサー(ABI PRISM 377, PE Biosystems 社製)で DNA 塩基配列を解析した。

実施例 2. シグナル配列をもつクローニングの選択

5' - 端配列の中のすべての ATG コドンから予測される推定アミノ酸配列について、中井・金久が開発したタンパク質の局在性予測プログラム「PSORT」を用い、多くの分泌タンパク質のアミノ末端に特徴的なシグナルペプチドと予測される配列の有無を解析することにより、シグナル配列をもつと予測されるクローニングを特異的に選別した。

この選別により、分泌タンパク質、または膜タンパク質をコードしている可能性の高いクローニングを選ぶことができる。

5' - 端配列データ (onepass sequencing) から
ATGpr1[A.A.Salanmov, T.Nishikawa, M.B.Swindells, Bioinformatics, 14:384-390(1998); http://www.hri.co.jp/atgpr/] の最大値が 0.7 以上で、シグナル配列(PSORT で解析)を持ち、かつ、5' - 端配列データでの ORF が存在するものを選別した。

Next, deciding directionality of cDNA in vector pME18SFL3 (GenBank AB009864, Expression vector) which is cut off with Dralll, cloning it did, drew up cDNA library.

After insertion cDNA size excludes clone of 1 kb or less concerning plasmid DNA of clone which is acquired from these, following nucleotide sequence of 5' edges and 3' edges of cDNA to manual making use of DNA sequencing reagent (dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit or BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PEBiosystems supplied), after sequencing reaction, you analyzed DNA nucleotide sequence with DNA sequencer (ABI PRISM 377, PEBiosystems supplied).

Has Working Example 2. signal sequence selection of clone which

clone which is estimated that it has signal sequence, by analyzing the presence or absence of arrangement which is estimated in amino terminal of many secretory protein making use of localization estimate program "PSORT" of protein which Nakai * gold Hisashi developed concerning estimated amino acid sequence which is estimated from all ATGcodon in 5' - terminal sequence, characteristic signal peptide, was sorted in specific.

With this selection, clone where possibility which secretory protein, or the membrane protein cord has been done is high is chosen, it is possible.

maximum value
ATGpr1
[A.A.Salanmov
Ni
shikawa, M.B.S
lls, Bi
oinformatics, 14-390 (1998);
http://www.hri.co.jp/atgpr/]
0.7 or greater f
>- edge
sequence data
(onepass
sequencing), w
signal sequence
(You analyze v
PSORT), at sa
time, those wh
ORF with 5&a
edge sequence
exists were sor

THIS PAGE BLANK (USPTO)

実施例 3.PSEC0146 の配列決定

実施例 2 で選択したクローンについて、全長 cDNA の塩基配列、並びに推定アミノ酸配列を決定した。

塩基配列は、次に示す 3 種の方法を組み合わせ、各方法によって決定した塩基配列を完全にオーバーラップさせ、最終的な確定塩基配列を決定した。

決定された cDNA 配列から、推定アミノ酸配列を明らかにした。

(1)Licor DNA シーケンサーを用いた cDNA 挿入断片両末端からのロングリードシーケンス (Licor シーケンサー(アロカ社販売)のマニュアルに従ってシーケンシング反応後、Licor シーケンサーで DNA 塩基配列を解析した)、

(2)AT2 トランスポゾン試験管内転移を用いた Primer Island 法によるネステッドシーケンス [S.E.Devine and J.D.Boeke,Nucleic Acids Res.,22:3765-3772,(1994)](PE Biosystems 社製のキットとマニュアルにしたがってクローンを取得後、PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

(3)カスタム合成 DNA プライマーを用いたダイデオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング(カスタム合成 DNA プライマーをもつ PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)これらの配列について、ATGpr と PSORT による解析および GenBank や SwissProt に対する BLAST 解析を行った。

ほとんどのクローンが N-末端にシグナル配列をもつ分泌タンパク質、または膜タンパク質であると推定された。

このように決定された全長 cDNA の一つを、PSEC0146 と名づけた。

PSEC0146 の塩基配列を配列番号:1 に、この塩基配列によってコードされる推定アミノ酸配列を配列番号:2 に記載した。

実施例 4.COS 細胞による LTC₄受容体の発現と LTC₄との結合実験

以下の実験によって PSEC0146 がコードするタンパク質の LTC₄受容体活性を確認した。

sequencing of Working Example 3.PSEC 0146

nucleotide sequence、 and estimated amino acid sequence of total length cDNA were decided concerning clone which is selected with Working Example 2.

nucleotide sequence overlap doing nucleotide sequence which is decided with each method combining method of 3 kinds which are shown next, completely,decided final decision nucleotide sequence.

From cDNA sequence which is decided, estimated amino acid sequence was made clear.

long lead/read sequence from cDNA inserted fragment both ends which uses (1) Li cor DNA sequencer (Following to manual of Li corsequencer (Aloka Co. Ltd. (DB 69-058-1558) corporation sale), after sequencing reaction, you analyzed DNA nucleotide sequence with Li corsequencer.),

With Primer Island method which uses (2) AT2 transposons in vitro metastasis Ness Ted sequence [S.E.DeV ine and J.D.Boeke, Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD), 22: 3765 - 3772, (1994)] (Following to kit and manual of PEB iosystems supplied, after acquiring, following clone to manual with DNA sequencing reagent of PEB iosystems supplied, the sequencing reaction it did, analyzed DNA nucleotide sequence with ABIP RIS M 377.)

With dideoxy terminators method which uses (3) custom synthesis DNA primer analysis and BLAST analysis for GenBank and SwissProt were done with ATGpr and the PSORT primer war King (Following to manual with DNA sequencing reagent of PEB iosystems supplied making use of the custom synthesis DNA primer, sequencing reaction it did, analyzed DNA nucleotide sequence with ABIP RIS M 377.) concerning these arrangements.

It was presumed that it is a secretory protein、 or a membrane protein where most clone have signal sequence in N-terminal.

This way one of total length cDNA which is decided, was named PSEC 0146.

nucleotide sequence of PSEC 0146 in Sequence Number:1, with this nucleotide sequence estimated amino acid sequence which cord is done was stated in Sequence Number:2.

With Working Example 4.COS cell binding experiment of revelation and LTC₄ of LTC₄receptor

PSEC 0146 verified LTC₄receptor activity of protein which cord is done with experiment below:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

まずこの cDNA がコードするタンパク質を発現させるために、当該 cDNA をヒト脾臓由来の poly(A)+RNA(Clontech 社)を 鑄型として RT-PCR により取得した。

RT-PCR に必要なプライマーの塩基配列は、実施例 3 で決定した塩基配列情報をもとに設定した。

RT-PCR には、配列番号:7 で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、配列番号:8 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いた(それぞれの 5' 末端には XbaI site が付加してある)。

RT-PCR は Pyrobest DNA polymerase(宝酒造社)を用い 5% DMSO 存在下で 98 deg C(10 秒)/58 deg C(30 秒)/72 deg C(2 分)のサイクルを 34 回繰り返した。

その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。

この断片を XbaI で消化した後、pEF-BOS plasmid(Mizushima,S.and Nagata,S.(1990)Nucleic Acids Res.,18,5322)を用いてクローニングした。

得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems 社)を用いて解析した。

得られたプラスミドは、配列番号:2 に記載のアミノ酸配列の全長をコードする配列を含むことが確認された。

このプラスミドを pEF-BOS-PSEC0146 とした。

175mm² 培養フラスコに COS-1 細胞を 2x10⁶ 細胞で播種して 36 時間培養後、50 μg の pEF-BOS-PSEC0146 または pEF-BOS(空ベクター)を FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いて遺伝子導入した。

遺伝子導入後、36 時間培養した細胞を回収、洗浄後、20mM Tris.HCl(pH7.4), 5mM EDTA, に懸濁してポリトロンにてホモジナイズした。

超遠心後、50mM HEPES(pH7.4), 40mM MgCl₂, 1mM EGTA, に懸濁し、これを膜画分とした。

膜画分 5 μg に [³H]-LTC₄(第一化学薬品)を最終濃度 0.5~14x10⁻⁹M になるように加え、50mM HEPES(pH7.4), 40mM MgCl₂, 1mM EGTA, 5mM L-Serine, 10mM Borate, 2mM L-Cysteine, 2mM L-Glycine, からなる溶液 250 μl

First this cDNA in order to reveal protein which cord is done, acquired this said cDNA with RT-PCR poly of human spleen derivation (A)+RNA with (Clontech corporation) as template.

It set nucleotide sequence of primer which is necessary for RT-PCR, on the basis of nucleotide sequence information which is decided with Working Example 3.

It used oligonucleotide which is shown with Sequence Number:8 with oligonucleotide which is shown with Sequence Number:7 as forward primer, to RT-PCR, as reverse primer (In respective 5' terminal are added XbaI site.).

Under 5% DMSO existing 98 deg C (10 second) / 58 deg C (30 second) / cycle of 72 deg C (2 min) 34 times it repeated RT-PCR making use of Pyrobest DNA polymerase (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) corporation).

As a result, DNA fragment of approximately 1.0 kbp was done amplifying.

cloning it did this fragment digestion after doing, making use of the pEF-BOS plasmid (Mizushima,S. and Nagata,S. (1990) Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD), 18 and 5322) with XbaI.

You analyzed nucleotide sequence of clone which it acquires with dideoxy terminators method making use of ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems corporation).

plasmid which it acquires includes arrangement which total length of amino acid sequence which is stated in Sequence Number:2 cord is done, it was verified.

This plasmid was designated as pEF-BOS-PSEC 0146.

In 175 mm² culture flask seeding doing COS-1 cell with 2 x10⁶ cell, 36 hours cultures later, gene introduction it did pEF-BOS-PSEC 0146 or pEF-BOS (Empty vector) of 50; μg making use of FuGENE6 (Boeringer Mannheim corporation).

After gene introduction, 36 hours after recovering and washing, 20 mM Tris. HCl (pH 7.4), suspension doing cell which was cultured in 5 mM EDTA, the homogenize it did with Polytron.

After ultracentrifugation, 50 mM HEPES (pH 7.4), suspension it did in 40 mM Mg Cl₂, 1 mM EGTA,, designated this as membrane fraction.

50 mM HEPES (pH 7.4), room temperature 1 hour incubation it did in solution 250; μl which consists of 40 mM Mg Cl₂, 1 mM EGTA, 5 mM L-Serine, 10 mM Borate, 2 mM L-Cysteine, 2 mM L-Glycine, in membrane fraction 5; μg [³H]-LTC₄ in order to become final concentration

THIS PAGE BLANK (USPTO)

中で室温 1 時間インキュベーションし、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。

グラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで膜画分への総結合量を測定した。

さらに、前述の試験に最終濃度 $2 \mu M$ の LTC_4 (CAYMAN 社)を加えることで、膜画分への非特異的結合量を測定した。

その結果、 $[^3H]-LTC_4$ は pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分に特異的に結合することが分かった。

pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分への $[^3H]-LTC_4$ の特異的結合の飽和曲線を図 1 に示した。

また、この結合の Scatchard 分析の結果を図 2 に示した。

Scatchard 分析の結果から、pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分に対する LTC_4 の結合の解離定数は $K_d=2.20nM$ で、最大結合は $B_{max}=10.4\text{pmol}/\text{mg protein}$ であった。

一方、空ベクターを遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分では特異的結合は観察されなかった。

以上のように、本発明の LTC_4 受容体は、これまでその存在が示唆されながら実体が不明であつた LTC_4 に強い親和性を持つ受容体であることが確認された。

本 LTC_4 受容体で形質転換した細胞を用いることで初めて結合実験および拮抗薬のスクリーニングが可能となった。

実施例 5. HEK293-EBNA 細胞による LTC_4 受容体の発現と LTC_4 による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化

96well Black/clear bottom plate, collagen type I coated (BECTON DICKINSON 社 製) に HEK293-EBNA 細胞を 1 ウエルあたり 2.5×10^4 細胞で播種して 24 時間培養後、1 ウエルあたり 40ng の pEF-BOS-PSEC0146 または pEF-BOS(空ベクター)を FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いて遺伝子導入した。

遺伝子導入 24 時間後、培地を廃棄し、 $4 \mu M$ Fluo-3,AM (Molecular Probe 社 製)、0.004% pluronic acid および 10%FBS を含む DMEM を 1 ウエルあたり $100 \mu l$ 添加し、37 deg C で 1 時間

$0.5 \sim 14 \times 10^{-9} M$ (Daiichi Pure Chemicals Co. Ltd. (DB 69-059-3439)) to in addition, with cell harvester recovered in glass filter.

In glass filter total binding quantity to membrane fraction was measured with the liquid scintillation counter including micro scintillator.

Furthermore, by fact that LTC_4 (CAYMAN corporation) of final concentration $2 \mu M$ is added to aforementioned test, nonspecific binding amount to membrane fraction was measured.

As a result, $[^3H]$ as for $-LTC_4$ connects pEF-BOS-PSEC 0146 to specific understood in membrane fraction of COS-1 cell which gene introduction is done.

$[^3H]-LTC_4$ saturated curve of specific binding to membrane fraction of COS-1 cell which the pEF-BOS-PSEC 0146 gene introduction is done was shown in Figure 1.

In addition, result of Scatchard analysis of this connection was shown in Figure 2.

From result of Scatchard analysis, as for dissociation constant of connection of the LTC_4 for membrane fraction of COS-1 cell which pEF-BOS-PSEC 0146 gene introduction is done with $K_d=2.20 nM$, as for maximum connection it was a $B_{max}=10.4 \text{ pmol}/\text{mg protein}$.

With membrane fraction of COS-1 cell which on one hand, gene introduction does the empty vector you did not observe specific binding.

Like above, LTC_4 receptor of this invention, while existence being suggested so far, is receptor which has affinity which is strong in LTC_4 where substance is unclear, it was verified.

With this LTC_4 receptor for first time screening of binding experiment and the antagonist became possible by fact that cell which transformation is done is used.

With Working Example 5. HEK293-EBNA cell with revelation and LTC_4 of LTC_4 receptor change of intracellular Ca^{++} concentration

In 96 well Black/clear bottom plate, collagen type I coated (BECTON DICKINSON supplied) per 1 well seeding doing HEK293-EBNA cell with 2.5×10^4 cell, 24 hours cultures later, per 1 well gene introduction it did pEF-BOS-PSEC 0146 or the pEF-BOS (Empty vector) of 40 ng making use of FuGENE6 (Boeringer Mannheim corporation).

After gene introduction 24 hours, it abolished medium, $4 \mu M$ Fluo-3,AM (Molecular probe supplied), per 1 well $100 \mu l$ it added 0.004% pluronic acid and DMEM which includes 10%FBS, 1 hour incubation did with 37 deg C.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

インキュベーションした。

インキュベーション後、細胞を 20mM HEPES を含む Hanks

BSS(GIBCO 社製)で 4 回洗浄して、1 ウエルあたり 100 μ l の 20mM HEPES を含む Hanks BSS を添加した。

細胞内 Ca^{++} 濃度の変化は FLIPR(Molecular Device 社製)を用いて経時的に測定した。

すなわち、測定開始 10 秒後に LTC_4 を最終濃度 $2 \times 10^{-6} M$ から $1 \times 10^{-12} M$ になるように添加し、添加後、50 秒間は 1 秒ごとに、さらに 4 分間は 6 秒ごとに蛍光強度を測定した。

pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した細胞は LTC_4 の用量依存的な細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇が観察された。

一方、空ベクターを遺伝子導入した細胞では LTC_4 による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化は観察されなかつた。

結果を図 3 に示した。

図 3 は、pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した細胞の細胞内 Ca^{++} 濃度の変化データの蛍光強度の最高値を縦軸に、 LTC_4 の濃度を横軸にプロットしたものである。

pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した細胞の LTC_4 による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。

その結果、 LTC_4 の EC50=3.46nM であることがわかつた。

また同様に LTD_4 による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した結果、 LTD_4 の EC50=3.68nM であることがわかつた。

以上のように、本 LTC_4 受容体で形質転換した細胞は LTC_4 および LTD_4 に反応して用量依存的に細胞内 Ca^{++} 濃度の変化を誘導することが確認された。

細胞内 Ca^{++} 濃度の変化を測定することで、被験化合物の LTC_4 受容体活性を修飾する活性を検出することができる。

更に、この検出方法に基づいて LTC_4 受容体活性を低下させる化合物を選択することによって、アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングが可

10%FBS, 1 hour incubation did with 37 deg C.

After incubation, cell Hanks which includes 20 mM HEPES

4 times washing with BSS (GIBC Osupplied), per 1 well it added Hanks BSS which includes 20 mM HEPES of 100; μ l.

It measured change of intracellular Ca^{++} concentration in timewise making use of the FLIP R (Molecular DeV icesupplied).

LTC_4 in order from final concentration $2 \times 10^{-6} M$ to become $1 \times 10^{-12} M$, was added after namely, measurement start 10 second, after adding, as for 50 second in every second, furthermoreas for 4 min fluorescence intensity was measured in every 6 second.

gene introduction is done cell which rise of dose dependent intracellular Ca^{++} concentration of LTC_4 was observed pEF-BOS-PSEC 0146.

With cell which on one hand, gene introduction does empty vector you did not observe change of intracellular Ca^{++} concentration with LTC_4 .

Result was shown in Figure 3.

Figure 3, maximum value of fluorescence intensity of change data of intracellular Ca^{++} concentration of cell which pEF-BOS-PSEC 0146 gene introduction is done in vertical axis, concentration of LTC_4 is something which plot is done in horizontal axis:

dose dependency was analyzed with LTC_4 of cell which pEF-BOS-PSEC 0146 the gene introduction is done with Logistic regression method concerning change of intracellular Ca^{++} concentration.

As a result, it is a EC 50=3.46 nM of LTC_4 , understood.

In addition in same way concerning change of intracellular Ca^{++} concentration there result of analyzing dose dependency with Logistic regression method is EC 50=3.68 nM of the LTD_4 with LTD_4 , understood.

Like above, with this LTC_4 receptor as for cell which transformation is done reacting to LTC_4 and LTD_4 , it induces change of the intracellular Ca^{++} concentration it was verified in dose dependent.

By fact that change of intracellular Ca^{++} concentration is measured, activity which decorates LTC_4 receptor activity of compound being tested can be detected.

Furthermore, screening of agonist, antagonist became possible LTC_4 receptor activity the compound which decreases is selected on basis of this detection method depending upon:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

能となった。

実施例 6.LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の構築

ヒト LTC₄受容体を発現させるための発現ベクターとして pEF-BOS-dhfr-PSEC0146 を用いた。

10cm シャーレに CHO-dhfr(-)株を 1×10^6 細胞で α MEM(核酸存在)培地を用いて播種し 1 日培養後、8 μg の pEF-BOS-dhfr-PSEC0146 を FuGENE6(Boeringer Mannheim 社製)を用いて遺伝子導入した。

24 時間後、遺伝子導入した細胞を回収し、 α MEM(核酸非存在)培地/100nM Methotrexate(和光純薬社製)に懸濁後、段階希釈して 10cm シャーレに播き直した。

2 週間後に出現したコロニーを個別に取得し、LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞とした。

LTC₄との結合実験のために LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞を培養後、細胞を回収、洗浄し、20mM Tris.HCl(pH7.4), 5mM EDTA に懸濁してポリトロンにてホモジエナライズした。

超遠心後、50mM HEPES(pH7.4), 40mM MgCl₂, 1mM EGTA, に懸濁し、これを膜画分とした。

実施例 4 と同条件にて膜画分 15 μg に対して [³H]-LTC₄ の結合実験を行った。

実施例 5 と同様に、LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分への [³H]-LTC₄ の特異的結合の飽和曲線を書いた。

また、この結合の Scatchard 分析の結果から、LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分に対する LTC₄の結合の解離定数は Kd=2.65nM で、最大結合は Bmax=6pmol/mg protein であった。

また、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化の測定のために、96well Black/clear bottom plate(BECTON DICKINSON 社製)に LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞を 1 ウエルあたり 2×10^4 細胞で播種して 24 時間培養後、培地を廃棄し、4 μM Fluo-3,AM(Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid、1%FBS、20mM HEPES、2.5mM probenecid を含む Hanks BSS を 1 ウエルあたり 100 μl 添加し、37 deg C で 1 時間インキュベーションした。

LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化は実施例 5 と同条件にて FLIPR を用いて測

is selected on basis of this detection method depending upon.

Construction of Working Example 6.LTC₄receptor stable expression CHOcell

pEF-BOS-dhfr-PSEC 0146 was used as expression vector in order to reveal human LTC₄receptor.

In 10 cm petri dish CHO-dhfr (-) strain seeding it did with 1×10^6 cell making use of the α MEM (nucleic acid existence) medium and 1 day culture later, gene introduction it did pEF-BOS-dhfr-PSEC 0146 of 8;μg making use of FuGENE6(Boeringer Mannheim supplied).

24 hours later, cell which gene introduction is done it recovered, after suspension, step diluted in the α MEM (nucleic acid absence) medium/100 nM methotrexate (Wako Pure Chemical Industries Ltd. (DB 69-059-8875) supplied) and did again to sow in 10 cm petri dish.

You acquired colony which appears 2 weeks later individually, made LTC₄receptor stable expression CHOcell.

Because of binding experiment of LTC₄ LTC₄receptor stable expression CHOcell after culturing, it recovered, washed cell, 20 mM Tris. HCl (pH 7.4), suspension did in 5 mM EDTA and homogenize did with Polytron.

After ultracentrifugation, 50 mM HEPES (pH 7.4), suspension it did in 40 mM Mg Cl₂, 1 mM EGTA, designated this as membrane fraction.

[³H]-LTC₄ binding experiment was done with same condition as Working Example 4 vis-a-vis membrane fraction 15;μg.

In same way as Working Example 5, [³H]-LTC₄ saturated curve of specific binding to the membrane fraction of LTC₄receptor stable expression CHOcell was written.

In addition, from result of Scatchard analysis of this connection, as for dissociation constant of connection of LTC₄ for membrane fraction of LTC₄receptor stable expression CHOcell with Kd=2.65 nM, as for maximum connection it was a Bmax=6 pmol/mg protein.

In addition, for measuring change of intracellular Ca⁺⁺concentration, in 96 well Black/clear bottom plate (BECTON DICKINSON supplied) per 1 well seeding doing LTC₄receptor stable expression CHOcell with 2×10^4 cell, 24 hours cultures later, it abolished medium, 4;μM Fluo-3,AM (Molecular probe supplied), per 1 well 100;μl it added Hanks BSS which includes 0.004% pluronic acid, 1%FBS, 20 mM HEPES, 2.5 mM probenecid, 1 hour incubation did with 37 deg C.

With LTC₄ and LTD₄ it measured change of intracellular Ca⁺⁺concentration with same condition as Working Example 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

定した。

LTC₄受容体安定発現CHO細胞のLTC₄およびLTD₄による細胞内Ca⁺⁺濃度の変化についてLogistic回帰法により用量依存性を解析した。

その結果、LTC₄のEC₅₀=0.44nM、LTD₄のEC₅₀=0.59nMであることがわかった。

以上のように、本LTC₄受容体安定発現CHO細胞においても、COS細胞やHEK293-EBNA細胞に一過的に発現させたときと同様に、LTC₄に強い親和性を持ち、LTC₄に反応して用量依存的に細胞内Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。

実施例7.組織におけるヒトLTC₄受容体の遺伝子発現分布

ノーザンプロットハイブリダイゼーション法によりヒトLTC₄受容体遺伝子の発現分布を解析した。

ヒトLTC₄受容体遺伝子のプローブにはcDNA断片(配列番号:1の第947番目から第1626番目)を用いた。

ヒトの各臓器由来のpolyA+RNA(2μg)をプロットしたメンブレン(Clontech社製)とプローブのハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド、5xSSPE、10xDenhardt's溶液、2%SDS、100μg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中で、42degC(22時間)で行った。

メンブレンは、最終的に0.2xSSC、0.1%SDSを含む溶液で2回(65degC、20分)洗浄した。

ヒトの各臓器(心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、胰臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球、胃、甲状腺、脊髄、リンパ節、気管、副腎、骨髄)についてノーザン解析を行ったところ、図4に示すように約5kbのmRNAが心臓、胎盤、脾臓、末梢血白血球、副腎で強く検出された。

脳、腎臓、前立腺、卵巣、脊髄、リンパ節でも若干シグナルが検出された。

以上のことから、本LTC₄受容体はペプチドヨコトリエンに起因する心臓血管障害、炎症やアレルギー症状への関与が予想された。

実施例8.心臓血管系におけるヒトLTC₄受容体の遺伝子発現分布

PCR法によりヒトLTC₄受容体遺伝子の心臓血

making use of FLIP R.

dose dependency was analyzed with LTC₄ and LTD₄ of LTC₄receptor stable expression CHOcell with Logistic regression method concerning change of intracellular Ca⁺⁺concentration.

As a result, it is a EC 50=0.59 nM of EC 50=0.44 nM、LTD₄ of LTC₄, understood.

Like above, regarding this LTC₄receptor stable expression CHOcell, when revealing pass in COS cell and HEK293-EBNAcell, in same way, reacting to LTC₄ with affinity which is strong in LTC₄, it induces rise of intracellular Ca⁺⁺concentration it was verified in dose dependent.

gene expression distribution of human LTC₄receptor in Working Example 7. organization

Revelation distribution of human LTC₄receptor gene was analyzed with Northern blot hybridization method.

cDNA fragment (From 9th 47th of Sequence Number:1 16th 26th) was used to probe of human LTC₄receptor gene.

membrane which poly A+RNA (2;μg) of each organ derivation of human the blot is done (Clontechsupplied) with in solution which includes 50% formamide, 5x SSPE, 10x Denhardt's solution, 2% SD S, 100;μg/ml degeneration salmon sperm DNA, it did hybridization of probe with 42 deg C (22 hours).

twice (65 deg C, 2 0 min) you washed membrane, with solution which includes the finally 0.2xSSC, 0.1%SD S.

When you analyzed Northern concerning each organ (heart, brain, placenta, lung, liver, skeletal muscle, kidney, pancreas, spleen, thymus, prostate, testes, ovary, small intestine, intestine, peripheral blood leucocyte, stomach, thyroid, spine, lymph node, tracheum, adrenal, bone marrow) of human, as shown in Figure 4, mRNA of approximately 5 kb being the heart, placenta, spleen, peripheral blood leucocyte, adrenal, it was detected strongly.

signal was detected somewhat even with brain, kidney, prostate, ovary, spine, lymph node.

From thing above, as for this LTC₄receptor participation to cardiovascular damage, inflammation and the allergy disease which originate in peptide leucotriene was expected.

gene expression distribution of human LTC₄receptor in Working Example 8. cardiac vascular system

Revelation distribution in cardiac vascular system of human

THIS PAGE BLANK (USPTO)

管系における発現分布を解析した。

PCR にはヒトの心臓各部位(左心房、右心房、左心室、右心室、動脈、静脈、心室中隔、心膜)由来の一本鎖 cDNA(BioChain 社製)を錆型として、配列番号:9 で示されるオリゴヌクレオチドをフォーワードプライマーとして、また、配列番号:10 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーを用いた。

PCR は Taq DNA polymerase(宝酒造社製)を用い 5% DMSO 存在下で 94 deg C(30 秒)/50 deg C(30 秒)/72 deg C(1 分)のサイクルを 30 回繰り返した。

また、内部標準としては上記のヒトの各部位の cDNA を錆型として、Human G3PDH Control Amplimer Set(Clontech 社製)を用いて、同条件の PCR を行った。

反応産物は 1%アガロースゲルにて電気泳動して解析した。

また、正常ヒト冠動脈内皮細胞、正常ヒト冠動脈平滑筋細胞、正常ヒト肺微小血管内皮細胞、正常ヒト成人皮膚微小血管内皮細胞、正常ヒト新生児皮膚微小血管内皮細胞、正常ヒト大動脈内皮細胞、正常ヒト肺動脈内皮細胞、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(Clontech 社製)から ISOGEN(日本ジーン社製)を用いて total RNA を精製した。

各細胞由来の total RNA 5 μg を DNase(Nippon Gene 社製)を用い 37 deg C で 15 分反応させた。

DNase 処理した total RNA をスーパースクリプトファーストストランドシステム (RT-PCR 用)(GIBCO 社製)にて cDNA 変換した。

この cDNA を錆型として上記と同条件にて PCR を行った。

その結果を図 5 に示した。

LTC₄受容体の約 450bp の増幅産物は左心房、右心房、左心室、右心室および冠動脈平滑筋細胞で強く検出された。

また、心室中隔、心膜、肺微小血管内皮細胞、成人皮膚微小血管内皮細胞、新生児皮膚微小血管内皮細胞、肺動脈内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞にも弱いシグナルが検出された。

LTC₄receptor gene with PCR method was analyzed.

In PCR with oligonucleotide which is shown with Sequence Number:9 with the single-strand cDNA (BioChain supplied) of heart each site (left atrium, right atrium, left ventricle, right ventricle, artery, vein, ventricle septum, heart sac) derivation of human as template, as forward primer, in addition, oligonucleotide which is shown with Sequence Number:10 the reverse primer was used.

PCR under 5% DMSO existing 94 deg C (30 second) / 50 deg C (30 second) / 30 times repeated cycle of 72 deg C (1 min) making use of Taq DNA polymerase (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) supplied).

In addition, as internal standard PCR of same condition was done with cDNA of each site of above-mentioned human as template, making use of human G3PDH Control Amplimer Set (Clontech supplied).

electrophoresis doing with 1% agarose gel, you analyzed reaction product.

In addition, total RNA was refined making use of ISOGEN (Japan gene supplied) from the normal human coronary artery endothelial cell, normal human coronary artery smooth muscle cell, normal human lung microangiopathic endothelial cell, normal human adult skin microangiopathic endothelial cell, normal human newborn skin microangiopathic endothelial cell, normal human aorta endothelial cell, normal human pulmonary artery endothelial cell, normal human umbilical vein endothelial cell (Clontech supplied).

15 min it reacted with 37 deg C total RNA 5 μg of each cell derivation making use of DNase (Nippon Gene (0378-1119, GENED6) supplied).

DNase total RNA which was treated cDNA was converted with the super script fast strand system (For RT-PCR) (GIBCO supplied).

PCR was done with same condition as description above with this cDNA as template.

Result was shown in Figure 5.

amplification product of approximately 450 bp of LTC₄receptor was detected strongly with left atrium, right atrium, left ventricle, right ventricle and coronary artery smooth muscle cell.

In addition, signal which is weak to also ventricle septum, heart sac, lung microangiopathic endothelial cell, adult skin microangiopathic endothelial cell, newborn skin microangiopathic endothelial cell, pulmonary artery endothelial cell, umbilical vein endothelial cell was detected.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

以上の結果からペプチドリコトリエンの機能として知られている心収縮力や冠血流量の低下作用に本 LTC₄受容体が関与していることが予想された。

実施例 9. 血球細胞におけるヒト LTC₄受容体の遺伝子発現分布

健常人ボランティアよりヘパリン採血し、6%デキストラン/生理食塩水を1/3量加えて室温にて1時間放置した。

上清を取り、150xgで5分遠心処理後、沈査をHunk's Balanced Salt Solution(HBSS)に懸濁した。

これを等量のFicoll-Paque(Pharmacia社)に重層し、400xgで30分遠心処理を行った。

中間層を単核球画分、沈査を多核白血球として分取した。

多核白血球は、CD16マイクロビーズ(第一化学薬品社製)を加え、磁器スタンドにて好中球画分と好酸球画分に分離した。

単核球画分、好中球画分、好酸球画分のそれぞれは生理食塩水にて洗浄後、ISOGEN(日本ジーン社製)を用いてtotal RNAを精製した。

各分画由来のtotal RNA 5 μgをDNase(Nippon Gene社製)を用い37degCで15分反応させた。

DNase処理したtotal RNAをスーパースクリプトファーストストランドシステム(RT-PCR用)(GIBCO社製)にてcDNA変換した。

LTC₄受容体の発現分布は上記血球画分のcDNAを錆型として、実施例8と同一の条件でPCR解析を行った。

LTC₄受容体の約450bpの増幅産物は健常人A、Bともに各血球画分で検出された。

とりわけ好酸球でよく検出された。

以上の結果から好酸球を起因とする疾患、例えば、喘息などのアレルギー疾患に本 LTC₄受容体が関与していることが予想された。

実施例 10. ヒト LTC₄受容体遺伝子の染色体の位置の決定

ヒト LTC₄受容体遺伝子の染色体の位置を決定

This LTC₄receptor has participated in decreasing action of cardiac contractility and crown blood flow which are known as function of peptide leucotriene from result above, it was expected.

gene expression distribution of human LTC₄receptor in Working Example 9. erythrocyte

heparin (INN392) blood drawing it did from healthy person volunteer; 1/3 quantity added 6% dextran/physiological saline and 1 hour left with room temperature.

supernatant was taken, with 150 xg 5 min centrifugation later, sinking inspectionsuspension was done in Hunk's Balanced Salt solution (HBSS).

double layer it did this in Ficoll-Paque (Pharmacia corporation) of equivalent, did 30 min centrifugation with 400 xg.

intermediate layer fraction collection was done with monocyte fraction, sinking inspection as the polynuclear leukocyte.

It separated polynuclear leukocyte, into neutrophil fraction and eosinophil fraction with porcelain stand including CD 16 micro beads (Daiichi Pure Chemicals Co. Ltd. (DB 69-059-3439) supplied).

Each one of monocyte fraction, neutrophil fraction, eosinophil fraction after washing, refined total RNA with physiological saline making use of ISOGEN (Japan gene supplied).

15 min it reacted with 37 deg C total RNA 5 μg of each fraction derivation making use of DNase (Nippon Gene (0378-1119, GENED6) supplied).

DNase total RNA which was treated cDNA was converted with the super script fast strand system (For RT-PCR) (GIBCO supplied).

Revelation distribution of LTC₄receptor analyzed PCR with same condition as Working Example 8 with cDNA of above-mentioned blood cell fraction as template.

amplification product of approximately 450 bp of LTC₄receptor both healthy person A, B was detected with each blood cell fraction.

A eosinophil being it was detected especially well.

This LTC₄receptor has participated in disease, for example asthma or other allergy which makes eosinophil originating from result above, it was expected.

Decision of position of chromosome of Working Example 10. human LTC₄receptor gene

In order to decide position of chromosome of human

THIS PAGE BLANK (USPTO)

するために、ヒト/ハムスターラジエーションハイブリッドパネル GeneBridge 4 panel(Sanger Center) および G3 panel(Stanford University)(Research Genetics 社製)を録型に、配列番号:11で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、また、配列番号:12で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとしてPCRを行った。

PCR は Pyrobest DNA polymerase(宝酒造社)を用い 5% DMSO 存在下で 98 deg C(10 秒)/58 deg C(30 秒)/72 deg C(2 分)のサイクルを 34 回繰り返した。

パネル内の各ベクターに対して LTC₄ 受容体に特異的な約 600bp の DNA 断片の増幅の有無をポジティブ、ネガティブとして、その結果をインターネットを介して <http://www.genome.wi.mit.edu> 、および <http://www-shgc.stanford.edu/RH/index.html> にて解析した。

その結果、本 LTC₄ 受容体遺伝子はクロモソーム 13q14 の染色体マークーの D13S153(GeneBridge 4)と SHGC-12474(G3)に最も近かった。

この染色体位置はアトピー性の喘息とのリンク (Kimura,K.,et al.(1999)Human Molecular Genetics 8,1487-1490)が示されている。

また、この染色体位置は B 細胞白血病患者で遺伝子の欠失が確認されている (Kalachikov,S.,et al.(1997)Genomics 42,369-377)。

本 LTC₄ 受容体遺伝子の変異が上記の疾患と相關していることが予想された。

実施例 11.LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞を用いた LTC₄ 受容体と LTC₄ の結合を阻害する化合物のスクリーニング

実施例 6 で作製した LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分を用いて LTC₄ の結合を阻害する活性を指標に候補化合物のスクリーニングを行った。

実際には、LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分 15 μg を含む 50mM HEPES(pH7.4), 40mM MgCl₂, 1mM EGTA, 5mM L-Serine, 10mM Borate, 2mM L-Cystein, 2mM L-Glycine, からなる溶液に一定濃度の候補化合物と 0.5x10⁻⁹M の [³H]-LTC₄ を添加し、室温で 1 時間インキュベーションした後、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。

LTC₄ receptor gene, human/hamster radiation hybrid panel Gene (0378 - 1119, GENED6) Bridge 4 panel (Sanger Center) and G3 panel (Stanford University) (research genetics supplied) in template, with oligonucleotide which is shown with Sequence Number:11 as forward primer, in addition, PCR was done with oligonucleotide which is shown with Sequence Number:12 as reverse primer.

Under 5% DMSO existing 98 deg C (10 second) / 58 deg C (30 second) / cycle of 72 deg C (2 min) 34 times it repeated PCR making use of Pyrobest DNA polymerase (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) corporation).

Was analyzed with <http://www.genome.wi.mit.edu>、and <http://www-shgc.stanford.edu/RH/index.html> with presence or absence of amplifying of DNA fragment of specific approximately 600 bp as positive, negative, vis-a-vis each vector inside panel in LTC₄ receptor, result through Internet.

As a result, this LTC₄ receptor gene D13S153 of chromosome marker of Papenfussiella kuromo ゾーム 13 q14 (Gene (0378 - 1119, GENED6) Bridge 4) with was closest to SHG C-12474 (G3) .

As for this chromosome position linkage (Kimura,K.,et al. (1999) human Molecular genetics 8,1487-1490) of atopic asthma is shown.

In addition, as for this chromosome position deficiency of gene is verified with B cell leukemia patient, (Kalachikov,S.,et al. (1997) Genomics 42,369-377) .

mutation of this LTC₄ receptor gene has done above-mentioned disease and the correlation, it was expected .

screening of compound which connection of LTC₄ receptor and LTC₄ which use Working Example 11.LTC₄ receptor stable expression CHOcell inhibition is done

activity which connection of LTC₄ inhibition is done screening of candidate compound was done in index making use of membrane fraction of LTC₄ receptor stable expression CHOcell which is produced with Working Example 6.

Actually, 50 mM HEPES which include membrane fraction 15 μg of LTC₄ receptor stable expression CHOcell (pH 7.4), candidate compound and 0.5 x 10⁻⁹M of constant concentration it added [³H]-LTC₄ in solution which consists of 40 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM L-Serine, 10 mM Borate, 2 mM L-Cystein, 2 mM L-Glycine, with room temperature 1 hour incubation after doing, with cell harvester it recovered in glass filter.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

グラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

また、同時に前述の試験において候補化合物を添加しないもの、最終濃度 $1 \mu M$ の LTC_4 を加えたものをそれぞれ総結合量、非特異的結合量として放射活性を測定した。

このような条件で、 IC_{50} が $10 \mu M$ 以下の化合物として、例えば、 N -(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-6-(1-propyl-1H-benzimidazol-2-yl)-1-naphthalenesulfonamide(化合物 A)が挙げられる。

この化合物は LTC_4 受容体と LTC_4 の結合を用量依存的に阻害し、その IC_{50} は $1.2 \mu M$ であった。

なお化合物 A は以下の方法で製造した。

製造例 1

1H NMR は内部標準としてテトラメチルシラン (δ :0.00ppm)を用いた。

製造例 1-1 2-(2-ナフチル)ベンズイミダゾール

塩化メチレン(40ml)にフェニレンジアミン 2.335g を加え、さらに2-塩化ナフチル 4.105g を加えて室温にて一晩攪拌した。

溶媒を留去し、無色固体 6.391g を得た。

この固体に1,3-ジメチル-2-イミダゾリジン 40ml を加えて 170 deg C で一晩攪拌した。

減圧下溶媒を留去し、残差をエーテルに溶解した後、飽和重曹水、飽和食塩水にて洗浄した。

エーテル層を硫酸マグネシウムで脱水後、溶媒を留去すると褐色固体が約 6.5g 得られた。

この祖生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム)にて分離・精製すると、2-(2-ナフチル)ベンズイミダゾールが 3.514g(67%)得られた。

GC MS;244(M+)

In glass filter radioactivity was measured with liquid scintillation counter including the micro scintillator.

In addition, simultaneously those which do not add candidate compound at the time of aforementioned testing, radioactivity was measured respective total binding quantity, those which add LTC_4 of final concentration $1 \mu M$ as nonspecific binding amount.

With this kind of condition, IC_{50} for example N -(3 and 4 -dimethyl-5-isoxazolyl)-6-(1 -propyl-1H-benzimidazol-2-yl)-1-naphthalene sulfonamide you can list (compound A) as compound of $10 \mu M$ or less.

This compound connected LTC_4 receptor and LTC_4 in dose dependent inhibition, IC_{50} was $1.2 \mu M$.

Furthermore it produced compound A with method below.

Production Example 1

$<sup>1H$ nmr used tetramethylsilane (δ : 0.00 ppm) as internal standard.

Production Example 1-1 2-(2-naphthyl)benzimidazole

To methylene chloride (40 ml) overnight it agitated with room temperature including the phenylenediamine 2.335g, furthermore 2-chloride naphthoyl 4.105g including.

solvent was removed, colorless solid 6.391g was acquired.

To this solid overnight it agitated with 170 deg C including 1 and 3-dimethyl-2-imidazolidinone 40 ml.

It removed solvent under vacuum, after melting residue in the ether, it washed with sodium bicarbonate-saturated water, saturated saline.

When after dehydration, solvent is removed with magnesium sulfate, brown solid approximately 6.5 g acquired ether layer.

When this ancestor/founder product separation and purification is done with silica gel column chromatography (chloroform), 2-(2-naphthyl)benzimidazole acquired 3.514 g (67%).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

GCMS;244 (M ⁺)												
製造例1-	2-2-(2-ナ	フチ	ル			プロ	ロピル	ズ	ミ	ダゾ		ル
Production Example 1	2-ナ 22-	フ jp8	jp11			professional	Ro pill	一 ズ	一 ミ	一 ダゾ		jp11

6gをN,N-ジメチルホルムアミド20mlに溶解し、60%水素化ナトリウム300mgを加えた。

15分攪拌後、ヨウ化プロピル0.72mlを加え、1時間攪拌した。

減圧下、溶媒を留去した後、1規定水酸化ナトリウム水溶液を加え、エーテルにて抽出した。

エーテル層を硫酸マグネシウムで脱水後、溶媒を留去すると赤みを帯びた残渣が得られた。

この祖生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-ヘキサン;1:1~クロロホルムのみ)にて分離・精製すると無色固体の2-(2-ナフチル)-1-プロピルベンズイミダゾールが1.195g(77%)得られた。

¹H NMR(90MHz,CDCl₃);0.85(t,3H),
1.74-1.99(m,2H),
4.18-4.35(m,2H),
7.25-8.21(m,11H)

GC MS;286(M⁺)

製造例 1-3 N-(3,4-ジメチル-5-イソキサゾリル)-6-(1-プロピルイミダゾール-2-イル)ナフタレンスルホンアミド

製造例 1-2 で得られた2-(2-ナフチル)-1-プロピルベンズイミダゾール1.601gをクロロホルム4mlに溶解し、室温にてクロロ硫酸(1.2ml)クロロホルム溶液(2ml)を滴下した。

滴下後、2時間加熱還流し、放冷すると反応液が上層(クロロホルム層)と下層(生成物)に分離した。

上層を分離し、下層をクロロホルムで洗浄すると、褐色油状物が得られた。

この化合物にプロピルアミン3.2ml、クロロホルム2mlを加え、5分間加熱還流した。

放冷後、オキシ塩化リン10mlを加え、さらに30分間加熱還流した。

放冷後、反応液を氷水に注ぎ、クロロホルムにて抽出した。

クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水にて洗浄した後、硫酸マグネシウムにて脱水した。

6g were melted in N, N- dimethylformamide 20 ml, 60% sodium hydride 300 mg was added.

Including 15 min after stirring, propyl iodide 0.72 ml, 1 hour it agitated.

It extracted with ether under vacuum, after removing solvent, including 1 normal sodium hydroxide water solution.

When after dehydration, solvent is removed with magnesium sulfate, residue which has reddish acquired ether layer.

When this ancestor/founder product separation and purification is done with silica gel column chromatography (Only chloroform-hexane;1:1~chloroform),colorless solid 2-(2-naphthyl)-1-propyl benzimidazole acquired 1.195 g (77%).

¹H nmr (90 MHz, CDCl₃); 0.85 (t,3H), 1.74 - 1.99 (m,2H), 4.18 - 4.35 (m,2H), 7.25 - 8.21 (m,11H)

GCMS;286 (M⁺)

Production Example 1- 3 N- (3 and 4 -dimethyl-5-isoxazolyl) - 6 - (1 -propyl imidazole - 2 -yl) naphthalene sulfonamide

2 it acquires with Production Example 1- 2 - (2 -naphthyl) - 1 -propyl benzimidazole 1.601g was melted in chloroform 4 ml, chlorosulfonic acid (1.2 ml) chloroform solution (2 ml) was dripped with room temperature .

After dripping, when 2 hours heating and refluxing it does, cools reaction mixture top layer (chloroform layer) with separated into bottom layer (product).

When top layer is separated, bottom layer is washed with chloroform, thebrown oil acquired.

5 min heating and refluxing it made this compound including propyl amine 3.2 ml, chloroform 2 ml.

After cooling, including phosphorous oxychloride 10 ml, furthermore 30 min heating and refluxing it did.

After cooling, you poured reaction mixture to ice water, extracted with the chloroform .

After washing chloroform layer with sodium bicarbonate-saturated water, saturated saline, dehydration it did with the magnesium sulfate.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

減圧下、溶媒を留去し、粗生成物を 2.703g 得た。

この化合物の塩化メチレン(5ml)溶液を、5-アミノ-3,4-ジメチルイソキサゾール 457mg をピリジン 2ml に溶解したものに加えた。

一日攪拌後、クロロホルムを加え、0.1 規定塩酸、飽和食塩水にて洗浄した後、硫酸マグネシウムで脱水した。

減圧下、溶媒を留去すると褐色泡状物が得られた。

このものを中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール;100:1~10:1)にて分離し、得られた粗生成物をアセトン-ヘキサン-エーテルにて再結晶すると N-(3,4-ジメチル-5-イソキサゾリル)-6-(1-プロピルイミダゾール-2-イル)ナフタレンスルホンアミド 221mg(12%)が得られた。

¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):0.72(t,3H), 1.72(q,2H), 4.42(t,2H), 7.29-7.38(m,2H), 7.74-7.79(m,3H), 8.14(q,1H), 8.24(q,1H), 8.48(d,1H), 8.60(d,1H), 8.76(d,1H) FAB MS:461(M⁺+1) 実施例 12.LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞を用いた LTC₄による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を阻害する化合物のスクリーニング 実施例 6 で作製した LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞を 96well Black/clear bottom plate に 1 ウエルあたり 2x10⁴細胞で播種して 24 時間培養後、培地を廃棄し、4 μ M Fluo-3,AM(Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid、1%FBS、20mM HEPES、2.5mM probenecid を含む Hanks BSS を 1 ウエルあたり 100 μ l 添加し、37 deg C で 1 時間インキュベーションした。一定濃度の候補化合物の添加 5 分後に、1nM LTC₄を添加し、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化は実施例 6 と同条件にて FLIPR を用いて測定した。例えば、実施例 11 で選択した化合物 A は LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の LTC₄による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を用量依存的に抑制することから、LTC₄受容体のアンタゴニストであることが分かった。その IC₅₀ は 2.3 μ M であった。またこの化合物 A は、LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の LTD₄による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇も用量依存的に抑制した。実施例 13.LTC₄受容体発現 CHO 細胞の LTC₄による細胞遊走と LTC₄受容体アンタゴニストによる阻害 8 μ m ポア ポリカーボネットフレームフィルター(Neuroprobe 社製)を 10 μ g/ml フィブロネクチン(旭テクノグラス社)/PBS にて 4 deg C で一晩処理した。96blind ウエルチャンバー(Neuroprobe 社製)の下層に 0~1 μ M の LTC₄を入れ、フィブロネクチン処理したフレームフィルターをセットし、LTC₄受容体発現 CHO 細胞と空ベクター導入 CHO 細胞を α MEM(核酸非存在)培地/0.1% BSA で懸濁後、2x10⁵

did with the magnesium sulfate.

Under vacuum, solvent was removed, crude product 2.703 g was acquired.

It added to those which 5 -amino-3, 4- dimethyl isoxazole 457 mg melt methylene chloride (5 ml) solution of this compound, in pyridine 2 ml.

Including 1 day after stirring、chloroform, after washing with 0.1 normal hydrochloric acid, saturated saline, dehydration it did with magnesium sulfate.

When under vacuum, solvent is removed, brown foam ones acquired.

This is separated with medium pressure silica gel column chromatography (chloroform-methanol;100:1~10:1), when ancestor/founder product which is acquired recrystallization is done with acetone-hexane-ether N- (3 and 4 -dimethyl-5-isoxazolyl) - 6 -(1 -propyl imidazole - 2 -yl) naphthalene sulfonamide 221 mg (12%) acquired.

t,2H,7.29-7.38 (m,2H), 7.74 - 7.79 (m,3H), 8.14 (q,1H), 8.24 (q,1H), 8.48 (d,1H), 8.60 (d,1H), with LTC₄ which uses 8.76 (d,1H) FABMS:461 (M⁺+1) Working Example 12.LTC₄receptor stable expression CHOcell in 96 well Black/clear bottom plate per 1 well seeding doing LTC₄receptor stable expression CHOcell which is produced with screening Working Example 6 of the compound which rise of intracellular Ca⁺⁺concentration inhibition is done with 2 x10⁴cell, 24 hours cultures later, to abolish medium, 4:μ M Fluo-3,AM (Molecular probe supplied), Per 1 well 100:μ l it added Hanks BSS which includes 0.004%pl uronic acid, 1%FBS, 20 mM HEPES, 2.5 mM probenecid, 1 hour incubation did with 37 deg C. It added 1 nM LTC₄ after addition 5 min of candidate compound of constant concentration, it measured change of intracellular Ca⁺⁺concentration with same condition as Working Example 6 making use of FLIP R. compound A which is selected with for example Working Example 11 from fact that with the LTC₄ of LTC₄receptor stable expression CHOcell rise of intracellular Ca⁺⁺concentration is controled in dose dependent, is the antagonist of LTC₄receptor, understood . IC 50 was 2.3:μ M. In addition this compound A with LTD₄ of LTC₄receptor stable expression CHOcell controled also therise of intracellular Ca⁺⁺concentration in dose dependent. With LTC₄ of Working Example 13.LTC₄receptor expression CHOcell with cell chemotaxis and LTC₄receptor antagonist inhibition 8 :μ m pore ポ liquor Bonet jp7 frame filter (Neuroprobesupplied) with 10:μ g/ml fibronectin (Asahi techno glass corporation) /PBS overnight

THIS PAGE BLANK (USPTO)

細胞でチャンバー上層に播種した。37 deg C CO₂インキュベーターにて4時間培養後、フレームフィルターをメタノールにて固定し、Diff-Quik 染色キット(国際試薬株式会社)にて染色した。このフィルターの上層面(細胞をのせた側)を拭き取り、風乾後、プレートリーダー(Molecular Devices 社)で595nmの吸光度を測定した。その結果を図6に示した。LTC₄受容体発現CHO細胞はLTC₄によりフィルター下層へと遊走することが観察された。細胞遊走は、3nM濃度のLTC₄に対して遊走活性が最大となり、さらに高濃度では遊走活性が抑制されるというベル型の走化性を示した。本LTC₄受容体は細胞遊走を誘導する活性を有していることが確認された。上記細胞遊走系において、上層に一定濃度の実施例11で選択した化合物Aを添加し、下層に3nM LTC₄を添加して細胞遊走活性を測定した。その結果を図7に示した。この化合物は用量依存的にLTC₄による細胞遊走を抑制することが分かった。ペプチドロイコトリエンは好酸球や好中球(Spada,C.S.,et al.J.Leukoc.Biol.(1994)55,183-191、Folco,F.,et al.Novel Inhibitor of Leukotrienes(1999)83-100,Birkhauser Verlag,Basel)、また、血管内皮細胞(Kanayasu,T.et al.Biochem.Biophys.Res.Commun.(1989)159,572-578)の細胞遊走を誘導することが知られている。実施例8、9で示すように本LTC₄受容体は好酸球、好中球および血管内皮細胞に発現していることから、これらの細胞の細胞遊走を介して、炎症やアレルギー症状、例えば、喘息などの増悪化に関与していることが示唆された。以上のことから、本LTC₄受容体アンタゴニストは細胞遊走を抑制することによる抗炎症作用を有すると考えられる。実施例14.冠動脈平滑筋細胞のLTC₄による細胞内Ca⁺⁺濃度の上昇とLTC₄受容体アンタゴニストによる阻害 実施例8で本LTC₄受容体の発現を確認したヒト冠動脈平滑筋細胞を96well Black/clear bottom plateに1ウェルあたり4x10⁴細胞で播種して24時間培養し、細胞を洗浄後、SmBM培地(Clonetics社製)と置換し、さらに48時間培養した。培地を廃棄し、4μM Fluo-3,AM(Molecular Probe社製)、0.004% pluronic acid、1%FBS、20mM HEPES、2.5mM probenecidを含むHanks BSSを1ウェルあたり100μl添加し、37 deg Cで1時間インキュベーションした。LTC₄による細胞内Ca⁺⁺濃度の変化は実施例6と同条件にてFLIPRを用いて測定した。0.10⁻⁶~10⁻⁹Mについて測定した結果、ヒト冠動脈平滑筋細胞はLTC₄の用量依存的に細胞内Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。上記測定系において、一定濃度の実施例11で選択した化合物AまたはカルシウムチャンネルブロッカーであるNifedipine(フナコシ社製)で5分間前処理をし、LTC₄による冠動脈平滑筋細胞の細胞内Ca⁺⁺濃度の変化を測定した。その結果を図8に示した。この化合物は用量依存的にLTC₄による冠動脈平滑筋細胞の細胞内Ca⁺⁺濃度の上昇を抑制することが確認された。血管平滑筋細胞における

wastreated with 4 deg C. LTC₄ of 0 - 1;μM was inserted in bottom layer of 96 blindwell chamber (Neuroprobes supplied), fibronectin frame filter which was treated was set, LTC₄receptor expression CHOcell and empty vector introduction CHOcell with the; al MEM (nucleic acid absence) medium/0.1% BSA after the suspension, with 2 x 10⁵ cell seeding were done in chamber top layer. With 37 deg C CO₂incubator 4 hours cultures later, it locked frame filter with the methanol, dyed with Diff-Quik dyeing kit (International Reagents Corporation). top layer surface (Side which places cell) of this filter after wiping, air dry, absorbance of 595 nm was measured with plate reader (Molecular Devices s corporation). Result was shown in Figure 6. chemotaxis it does LTC₄receptor expression CHOcell to filter bottom layer with LTC₄, it was observed. As for cell chemotaxis, chemotactic activity becomes maximum vis-a-vis LTC₄ of 3 nM concentration, chemotaxis of bell shape that was shown furthermore with the high concentration chemotactic activity is controlled. This LTC₄receptor has had activity which induces cell chemotaxis, it was verified. In above-mentioned cell chemotaxis system, compound A which in top layer is selected with Working Example 11 of constant concentration was added, 3 nM LTC₄ were added to bottom layer and cell chemotactic activity was measured. Result was shown in Figure 7. As for this compound in dose dependent controls cell chemotaxis understood with LTC₄. As for peptide leucotriene eosinophil and neutrophil (Spada,C.S.,et al.J.Leukoc. Bi ol. (1994) 55,183 - 191, Folco,F.,et al.Novel In hibitor of Leukotrienes (1999) 83 - 100, Bi rkha user Verlag,Basel), in addition, cell chemotaxis of vascular endothelium cell (Kanayasu,T.et al. Biochemical and Biophysical Research Communications (0006 - 291 X, BBRCA) (1989) 159,572 - 578) is known is induced. As shown with Working Example 8, 9, this LTC₄receptor from fact that it has revealed in eosinophil, neutrophil and vascular endothelium cell, through cell chemotaxis of these cell, has participated in inflammation and allergy disease, for example asthma or other aggravation, it was suggested. From thing above, this LTC₄receptor antagonist is thought that it possesses antiinflammatory action by fact that cell chemotaxis is controlled. With LTC₄ of Working Example 14. coronary artery smooth muscle cell with rise and LTC₄receptor antagonist of intracellular Ca⁺⁺concentration revelation of this LTC₄receptor was verified with inhibition Working Example 8 <sup>1H nmr (400 MHz, DMSO-d₆); 0.72 (t,3H), 1.72 (q,2H), 4.42

THIS PAGE BLANK (USPTO)

る細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇が血管収縮を引き起こすことはよく知られている (Bolton,T.B.,et al.Physiol.Rev.(1979)59,606-718)。Nifedipine は血管平滑筋の細胞内への Ca^{++} の流入を抑制することにより血管拡張薬として狭心症や高血圧治療薬として利用されている (Silver,P.J.,Calcium Bolckers.Mechanisms of Action and Clinical Applications.(1982)37,Urban & Schwarzenberg,Baltimore)。実際に、上記の測定系において Nifedipine は細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇を抑制した。以上のことから、本 LTC_4 受容体アンタゴニストは血管平滑筋細胞の細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇を抑制することによる血管拡張作用を有すると考えられる。実施例 15. ブタ LTC_4 受容体遺伝子のクローニング 配列番号 1 で示した PSEC0146 遺伝子配列情報からデザインした配列番号:13 で示されるオリゴヌクレオチドと配列番号:14 で示されるオリゴヌクレオチドの組み合わせ、および、配列番号:15 で示されるオリゴヌクレオチドと配列番号:16 で示されるオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いて PCR 法によって cDNA を取得した。PCR はブタ骨格筋から ISOTISSUE(日本ジーン社製)にて取得したブタゲノム DNA を錆型として Pyrobest DNA polymerase を用い 5% DMSO 存在下で 98 deg C(10 秒)/50 deg C(30 秒)/72 deg C(2 分)のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、それぞれ約 1.0kbp および 0.6kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR-blunt(Invitrogen 社製)にクローニングし、得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer を用いて解析した。解析結果をコンティグして明らかになった塩基配列を配列番号:17 に示した。同配列は 1038 塩基のオープニングフレームを持っている。オープニングフレームから予測されるアミノ酸配列(345 アミノ酸)を配列番号:18 に示した。このアミノ酸配列はヒト LTC_4 受容体のアミノ酸配列と 77.7% の相同性を有していた。実施例 16. ラット LTC_4 受容体遺伝子のクローニング配列番号 1 で示した PSEC0146 遺伝子配列を用いた Genbank に対する BLAST(Basic local alignment search tool)[S.F.Altschul, et al.,J.Mol.Biol.,215,403-410(1990)]検索を行った結果、アクセション番号 AI178926 のラット脾臓 cDNA 由来の EST(Expression Sequence Tags)が高いスコアでヒットした。この AI178926 の配列情報はラット LTC_4 受容体遺伝子の一部の配列を示していることが予想されたので、この配列情報からデザインした配列番号:19 で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとし、また、PSEC1046 の遺伝子配列からデザインした配列番号:20 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして PCR 法によって cDNA を取得した。PCR はラット脾臓 cDNA(Clontech 社製)を錆型として、Pyrobest DNA polymerase を用い 5% DMSO 存在下で 98 deg C(10 秒)/55 deg C(30 秒)/72 deg C(2 分)のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、

THIS PAGE BLANK (USPTO)

約 1.3 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR-blunt にクローニングし、得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer を用いて解析した。明らかになつた塩基配列を配列番号:21 に示した。同配列は 930 塩基のオープンリーディングフレームを持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列(309 アミノ酸)を配列番号:22 に示した。このアミノ酸配列はヒト LTC₄ 受容体のアミノ酸配列と 72.6% の相同性を有していた。実施例 17. ブタ LTC₄ 受容体の発現と LTC₄ との結合実験および LTC₄、LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の上昇 以下の実験によって実施例 15 で得たブタ LTC₄ 受容体 DNA がコードするタンパク質の LTC₄ 受容体活性を確認した。まずこの cDNA がコードするタンパク質を発現させるために、当該 cDNA をブタゲノム DNA を鋳型として PCR により取得した。PCR に必要なプライマーの塩基配列は、実施例 15 で決定した塩基配列情報をもとに設定した。PCR には配列番号:23 で示されるオリゴヌクレオチドをフォーワードプライマーとし、配列番号:24 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いた(それぞれの 5' 末端には XbaI site が付加してある)。PCR は Pyrobest DNA polymerase を用い 5% DMSO 存在下で 98 deg C(10 秒)/55 deg C(30 秒)/72 deg C(2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pEF-BOS を用いてクローニングした。このプラスミドを pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体とした。実施例 4 と同条件にて pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分を調製し、膜画分 20 μg に対して [³H]-LTC₄ の結合実験を行った。pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分への [³H]-LTC₄ の特異的結合の飽和曲線を実施例 5 と同様に書いた。また、この結合の Scatchard 分析の結果から、pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分に対する LTC₄ の結合の解離定数は $K_d=2.89\text{nM}$ で、最大結合は $B_{\text{max}}=0.25\text{pmol/mg protein}$ であった。また、細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の変化の測定を実施例 5 と同条件にて HEK293-EBNA 細胞を用いて行った。pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体を遺伝子導入した HEK293-EBNA 細胞の LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の上昇について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄ の EC₅₀=5.0nM、LTD₄ の EC₅₀=3.3nM であることがわかった。以上のように、本ブタ LTC₄ 受容体は LTC₄ に強い親和性を持ち、LTC₄ および LTD₄ に反応して用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の上昇を誘導することが確認された。実施例 18. ラット LTC₄ 受容体の発現と LTC₄、LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の変化 以下の実験によって実施例 16 で得たラット LTC₄ 受容体 DNA がコードするタンパク質の LTC₄ 受容体活性を確認した。実施例 16 で得たラット LTC₄ 受容体遺伝子が導入された pCR-blunt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

を *Xba*I で消化してラット LTC₄ 受容体 DNA を pEF-BOS に導入した。このプラスミドを pEF-BOS-ラット LTC₄ 受容体とした。細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化の測定を実施例 5 と同条件にて HEK293-EBNA 細胞を用いて行った。pEF-BOS-ラット LTC₄ 受容体を遺伝子導入した HEK293-EBNA 細胞の LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄ の EC₅₀=19nM、LTD₄ の EC₅₀=7.7nM であることがわかった。以上のように、本ラット LTC₄ 受容体は LTC₄ および LTD₄ に反応して用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。産業上の利用の可能性 本発明によって提供される LTC₄ 受容体は、ヒトの LTC₄ に起因する疾患、例えば気管支炎や皮膚炎等の炎症性疾患、心筋梗塞等の心血管系の疾患、の予防及び/または治療剤としての該受容体作用薬の探索及び評価に有用である。本発明によって LTC₄ 受容体が精製されたタンパク質として、あるいは LTC₄ に応答する形質転換細胞として利用可能となり、LTC₄ 受容体のインビトロでの結合実験を可能とした。インビトロでの結合実験は、他の LTC₄ 受容体として作用するタンパク質の影響の無い、理想的な試験環境を現実のものとする。そして本発明によって提供される LTC₄ 受容体を用いたスクリーニング方法によって、該受容体の関与する疾患に対する治療薬として有用な化合物を選択することができる。また、本発明の LTC₄ 受容体をコードする DNA は LTC₄ 受容体の製造に利用されるのみならず、LTC₄ 受容体の変異や異常な発現変動に起因する疾患の診断に有用である。更に LTC₄ 受容体を認識する抗体は、LTC₄ 受容体作動薬、診断薬又はポリペプチドの分離精製の手段等に利用することができる。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

Helix Research Institute

<120> Peptide Leukotrien Receptor

<130> YH0022-PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-259986

<151> 1999-09-14

<160> 24

<170> Patent in Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2807

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (264)..(1301)

<400> 1

aagtctctca agtttgaagc gtcagcttca accaaacaaa ttaatggcta ttctacattc 60

aaaaatcagg aaatttaaat ttattatgaa atgtaatgca gcatgttagta aagacttaac 120

cagtgttta aaactcaact ttcaaagaaa agatagtatt gctccctgtt tcattaaaac 180

ctagagagat gtaatcagta agcaagaagg aaaaaggaa attcacaaag taacttttg 240

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tgtctgtttc ttttaaccc agc atg gag aga aaa ttt atg tcc ttg caa cca 293

Met Glu Arg Lys Phe Met Ser Leu Gln Pro

1

5

10

tcc atc tcc gta tca gaa atg gaa cca aat ggc acc ttc agc aat aac 341

Ser Ile Ser Val Ser Glu Met Glu Pro Asn Gly Thr Phe Ser Asn Asn

15

20

25

aac agc agg aac tgc aca att gaa aac ttc aag aga gaa ttt ttc cca 389

Asn Ser Arg Asn Cys Thr Ile Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Phe Pro

30

35

40

att gta tat ctg ata ata ttt ttc tgg gga gtc ttg gga aat ggg ttg 437

Ile Val Tyr Leu Ile Ile Phe Phe Trp Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu

45

50

55

tcc ata tat gtt ttc ctg cag cct tat aag aag tcc aca tct gtg aac 485

Ser Ile Tyr Val Phe Leu Gln Pro Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asn

60

65

70

gtt ttc atg cta aat ctg gcc att tca gat ctc ctg ttc ata agc acg 533

Val Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Ile Ser Thr

75

80

85

90

ctt ccc ttc agg gct gac tat tat ctt aga ggc tcc aat tgg ata ttt 581

Leu Pro Phe Arg Ala Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Trp Ile Phe

95

100

105

gga gac ctg gcc tgc agg att atg tct tat tcc ttg tat gtc aac atg 629

Gly Asp Leu Ala Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn Met

110

115

120

tac agc agt att tat ttc ctg acc gtc ctg agt gtt gtc cgt ttc ctg 677

Tyr Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu

125

130

135

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gca atg gtt cac ccc ttt cgg ctt ctg cat gtc acc acc agc atc agg agt 725
Ala Met Val His Pro Phe Arg Leu Leu His Val Thr Ser Ile Arg Ser
140 145 150

gcc tgg atc ctc tgt ggg atc ata tgg atc ctt atc atg gct tcc tca 773
Ala Trp Ile Leu Cys Gly Ile Ile Trp Ile Leu Ile Met Ala Ser Ser
155 160 165 170

ata atg ctc ctg gac agt ggc tct gag cag aac ggc agt gtc aca tca 821
Ile Met Leu Leu Asp Ser Gly Ser Glu Gin Asn Gly Ser Val Thr Ser
175 180 185

tgc tta gag ctg aat ctc tat aaa att gct aag ctg cag acc atg aac 869
Cys Leu Glu Leu Asn Leu Tyr Lys Ile Ala Lys Leu Gin Thr Met Asn
190 195 200

tat att gcc ttg gtg gtc tgc ctg cca ttt ttc aca ctc agc 917
Tyr Ile Ala Leu Val Val Gly Cys Leu Leu Pro Phe Phe Thr Leu Ser
205 210 215

atc tgt tat ctg ctg atc att cgg gtt ctg tta aaa gtg gag gtc cca 965
Ile Cys Tyr Leu Leu Ile Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Val Pro
220 225 230

gaa tcg ggg ctg cgg gtt tct cac agg aag gca ctg acc acc atc atc 1013
Glu Ser Gly Leu Arg Val Ser His Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Ile
235 240 245 250

atc acc ttg atc atc ttc ttc ttg tgt ttc ctg ccc tat cac aca ctg 1061
Ile Thr Leu Ile Ile Phe Phe Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Thr Leu
255 260 265

agg acc gtc cac ttg acg aca tgg aaa gtg ggt tta tgc aaa gac aga 1109
Arg Thr Val His Leu Thr Thr Trp Lys Val Gly Leu Cys Lys Asp Arg
270 275 280

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ctg cat aaa gct ttg gtt atc aca ctg gcc ttg gca gca gcc aat gcc 1157
Leu His Lys Ala Leu Val Ile Thr Leu Ala Leu Ala Ala Asn Ala
285 290 295

tgc ttc aat cct ctg ctc tat tac ttt gct ggg gag aat ttt aag gac 1205
Cys Phe Asn Pro Leu Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp
300 305 310

aga cta aag tct gca ctc aga aaa ggc cat cca cag aag gca aag aca 1253
Arg Leu Lys Ser Ala Leu Arg Lys Gly His Pro Gln Lys Ala Lys Thr
315 320 325 330

aag tgt gtt ttc cct gtt agt gtg tgg aga aag gaa aca aga gta 1301
Lys Cys Val Phe Pro Val Ser Val Trp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Val
335 340 345

taaggagctc ttagatgaga cctgttcttg tateccttg tccatcttca ttcaactcata 1361

gtctccaaat gactttgtat ttacatcaact cccaaacaaat gttgattctt aatattttgt 1421

tgaccattac ttttgttaat aagaccaact tcaaaaattt tattcagtgt attttcagtt 1481

gtttagtctt aatgagggat acaggaggaa aaatccctac tagagtccctg tgggctgaaa 1541

tatcagactg ggaaaaaaatg caaagcacat tggatccctac tttctttag atattgaacc 1601

agatctctgg cccatcaggc ttctaaatt ctcaaaaaga gccacaactt ccccagcttc 1661

tccagctccc ctgtcctctt caatcccttg agatatacgca actaacgcacg ctactggaaag 1721

ccccagagca gaaaaaaagc acatcctaag attcaggaa agactaactg tgaaaaggaa 1781

ggctgtccca taacaaagca gcatcaagtc ccaagtaagg acagtggagag aaaaggggaa 1841

gaaggattgg agcaaaagag aactggcaat aagttagggaa aggaagaatt tcattttgca 1901

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ttgggagaga ggttctaaca cactgaaggc aaccctattt ctactgtttc tctcttgcca 1961

gggttattagg aaggacagga aaagttaggag gaggatctgg ggcattgccc taggaaatga 2021

aagaatttgt tatagaatgg aagggggatc atcaaggaca tgtatctcaa attttcttt 2081

agatcgaggt tagttgacct tgctgcagtt ctccctccca ttaattcattt gggatggaag 2141

ccaaaaataa aagaggtgcc tctgaggatt agggttgagc actcaaggga aagatggagt 2201

agagggcaaa tagcaaaaagt tttttcactc ctgaaattctt attaacattt ccgcagaaga 2261

ttagtaggga gatgctgcct tcccttttga gatagtgttag aaaaacacta gatagtgtga 2321

gaggttcctt tctgtccatt gaaacaaggc taaggatact accaactact atcaccatga 2381

ccatttgtact gacaacaattt gaatgcagtc tccctgcagg gcagattatg ccaggcactt 2441

tacattttttt gatcccattt gacattcaca ccaaagctct gagttccattt ttacagctga 2501

agaaattgaa gcttagagaa attaagaagc ttgttaagt ttacacagct agtaagagtt 2561

ttaaaaatct ctgtgcagaa gtgtggctg ggtgcctcc ccaccactac cctgtaaac 2621

ttccaggaag attgggtgaa agtctgaata aaagctgtcc tttcctacca atttcctccc 2681

cctccctact ctacacaagaa aaccaaaaagt ttctcttcag agtgggtgac tcatagtaca 2741

gtaaaagggtg gaggtgatata ggcattctga aagttagggag ggactaagtc agtcgtcata 2801

ctaaac 2807

<210> 2

<211> 346

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Arg Lys Phe Met Ser Leu Gin Pro Ser Ile Ser Val Ser Glu
1 5 10 15

Met Glu Pro Asn Gly Thr Phe Ser Asn Asn Asn Ser Arg Asn Cys Thr
20 25 30

Ile Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Phe Pro Ile Val Tyr Leu Ile Ile
35 40 45

Phe Phe Trp Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Ser Ile Tyr Val Phe Leu
50 55 60

Gln Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Phe Met Leu Asn Leu
65 70 75 80

Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Ile Ser Thr Leu Pro Phe Arg Ala Asp
85 90 95

Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Trp Ile Phe Gly Asp Leu Ala Cys Arg
100 105 110

Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn Met Tyr Ser Ser Ile Tyr Phe
115 120 125

Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu Ala Met Val His Pro Phe
130 135 140

Arg Leu Leu His Val Thr Ser Ile Arg Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly
145 150 155 160

Ile Ile Trp Ile Leu Ile Met Ala Ser Ser Ile Met Leu Leu Asp Ser
165 170 175

THIS PAGE BLANK (UGP71)

Gly Ser Glu Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser Cys Leu Glu Leu Asn Leu
180 185 190

Tyr Lys Ile Ala Lys Leu Gln Thr Met Asn Tyr Ile Ala Leu Val Val
195 200 205

Gly Cys Leu Leu Pro Phe Phe Thr Leu Ser Ile Cys Tyr Leu Leu Ile
210 215 220

Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu Ser Gly Leu Arg Val
225 230 235 240

Ser His Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Ile Ile Thr Leu Ile Ile Phe
245 250 255

Phe Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Thr Leu Arg Thr Val His Leu Thr
260 265 270

Thr Trp Lys Val Gly Leu Cys Lys Asp Arg Leu His Lys Ala Leu Val
275 280 285

Ile Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Cys Phe Asn Pro Leu Leu
290 295 300

Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg Leu Lys Ser Ala Leu
305 310 315 320

Arg Lys Gly His Pro Gln Lys Ala Lys Thr Lys Cys Val Phe Pro Val
325 330 335

Ser Val Trp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Val
340 345

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 3

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligo-cap linker sequence

<400> 3

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligo (dT) primer sequence

<400> 4

gcggctgaag acggcctatg tggcctttt tttttttt tt

42

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 5

THIS PAGE BLANK (USPS)

agcatcgagt cggccttgtt' g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

gggtctagaa tggagagaaa atttatgtcc ttgc

34

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially

THIS PAGE BLANK (USPTO)

synthesized primer sequence

<400> 8

gggtctagac tattatactc ttgtttcctt tctcaaccac

40

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

tggatccctct gtgggatcat atgg

24

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

aattctcccc agcaaagtaa tagag

25

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

gttaaaagtg gaggtcccaag aatcggggct

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

agaaagcctg atgggccaga gatctggttc

30

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

cacaaagtaa ctttttgtt ctgtttc

27

<210> 14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

ttctccccag caaagtaata gag

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

tggatccctct gtgggatcat atgg

24

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

aacaggctc atctaag

17

THIS PAGE BLANK (U.S.P.T.O.)

<210> 17

<211> 1101

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CDS

<222> (14).. (1048)

<400> 17

tttttaattc agc atg gag aga aaa ctt atg tcc tta ctt cca tcc atc 49

Net Glu Arg Lys Leu Net Ser Leu Leu Pro Ser Ile

1

5

10

tcc cta tca gaa atg gaa ccc aat agt acc ttg ggc aat cac aat agc 97

Ser Leu Ser Glu Met Glu Pro Asn Ser Thr Leu Gly Asn His Asn Ser

15

20

25

aac agg agc tgc acc aca gaa aac ttc aag aga gaa ttt tac ccc att 145

Asn Arg Ser Cys Thr Thr Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Tyr Pro Ile

30

35

40

gtg tac cta gta ata ttt atc tgg gga gcc ttg gga aat ggc ttt tct 193

Val Tyr Leu Val Ile Phe Ile Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly Phe Ser

45

50

55

60

ata tat gtt ttc ctg aaa cct tat aag aag tcc aca tca gtc aat gtt 241

Ile Tyr Val Phe Leu Lys Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val

65

70

75

ttc atg cta aat ctg gcc att tcg gat ctc tta ttc aca atc aca ctg 289

Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Thr Ile Thr Leu

80

85

90

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ccc ttc agg gtt gac tat tac ctt aga ggc tcc aac ygg ata ttt ggg 337
Pro Phe Arg Val Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Xaa Ile Phe Gly
95 100 105

gac aca cct tgc agg att atg tct tat tct atg tat gtc aac atg tac 385
Asp Thr Pro Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Met Tyr Val Asn Met Tyr
110 115 120

agc agc att tat ttc ctg act gtg ctg agt gtt gtg cgt ttc ctg gca 433
Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu Ala
125 130 135 140

act gtt cac ccc ttc cgg ctc ctt cat acc acc agc atc aag aac gcc 481
Thr Val His Pro Phe Arg Leu Leu His Thr Thr Ser Ile Lys Asn Ala
145 150 155

tgg att ctc tgt ggg gtc ata tgg atc ttt att atg gct tcc tca aca 529
Trp Ile Leu Cys Gly Val Ile Trp Ile Phe Ile Met Ala Ser Ser Thr
160 165 170

gta ctt ctg aag aat ggc tct gag cag aaa gac aat gtc aca ttg tgc 577
Val Leu Leu Lys Asn Gly Ser Glu Gln Lys Asp Asn Val Thr Leu Cys
175 180 185

tta gag ctg aat tct aat aaa gtt act aaa ctg aag acc atg aac tac 625
Leu Glu Leu Asn Ser Asn Lys Val Thr Lys Leu Lys Thr Met Asn Tyr
190 195 200

gtt gcc ttg gtg gtg ggc ttt gtg ctg cca ttc ggc act ctc agc atc 673
Val Ala Leu Val Val Gly Phe Val Leu Pro Phe Gly Thr Leu Ser Ile
205 210 215 220

tgc tac ctg cta atc att cga gct ttg tta aag gta gag gtc cgg gag 721
Cys Tyr Leu Leu Ile Ile Arg Ala Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu
225 230 235

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tcc ggg ctg cgg ctt tct cac agg aag gca ttg atc acc gtc atc att 769
Ser Gly Leu Arg Leu Ser His Arg Lys Ala Leu Ile Thr Val Ile Ile
240 245 250

gct ttg atc atc ttt ctc ctg tgt ttc ctg ccc tat cac gta ctg aga 817
Ala Leu Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Val Leu Arg
255 260 265

acc ctt cac ctg ctc gaa tgg aaa gct gat aaa tgc aaa gac agg ctg 865
Thr Leu His Leu Leu Glu Trp Lys Ala Asp Lys Cys Lys Asp Arg Leu
270 275 280

cat aaa gct gtg gct gtc aca cta gct ttg gca gcg gcc aac agc tgc 913
His Lys Ala Val Ala Val Thr Leu Ala Leu Ala Ala Asn Ser Cys
285 290 295 300

ttc aat cct ttc ctc tat tac ttt gct ggg gag aat ttt aag gac aga 961
Phe Asn Pro Phe Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg
305 310 315

cta aag tct gca ctc agg aaa ggt cga cca cag aaa aca agg tgc ggt 1009
Leu Lys Ser Ala Leu Arg Lys Gly Arg Pro Gin Lys Thr Arg Cys Gly
320 325 330

ttc tct gtc tgt gtg tgg ctg aaa aag gaa acg aca gtg taaggattta 1058
Phe Ser Val Cys Val Trp Leu Lys Lys Glu Thr Arg Val
335 340 345

ttaggtgagg ctgttattat gtccttgcctt ttgtgtctac ccc 1101

<210> 18

<211> 345

<212> PRT

<213> Sus scrofa

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 18

Met Glu Arg Lys Leu Met Ser Leu Leu Pro Ser Ile Ser Leu Ser Glu

1 5 10 15

Met Glu Pro Asn Ser Thr Leu Gly Asn His Asn Ser Asn Arg Ser Cys

20 25 30

Thr Thr Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Tyr Pro Ile Val Tyr Leu Val

35 40 45

Ile Phe Ile Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly Phe Ser Ile Tyr Val Phe

50 55 60

Leu Lys Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Phe Met Leu Asn

65 70 75 80

Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Thr Ile Thr Leu Pro Phe Arg Val

85 90 95

Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Xaa Ile Phe Gly Asp Thr Pro Cys

100 105 110

Arg Ile Met Ser Tyr Ser Met Tyr Val Asn Met Tyr Ser Ser Ile Tyr

115 120 125

Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu Ala Thr Val His Pro

130 135 140

Phe Arg Leu Leu His Thr Thr Ser Ile Lys Asn Ala Trp Ile Leu Cys

145 150 155 160

Gly Val Ile Trp Ile Phe Ile Met Ala Ser Ser Thr Val Leu Leu Lys

165 170 175

Asn Gly Ser Glu Gln Lys Asp Asn Val Thr Leu Cys Leu Glu Leu Asn

180 185 190

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ser Asn Lys Val Thr Lys Leu Lys Thr Met Asn Tyr Val Ala Leu Val
195 200 205

Val Gly Phe Val Leu Pro Phe Gly Thr Leu Ser Ile Cys Tyr Leu Leu
210 215 220

Ile Ile Arg Ala Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu Ser Gly Leu Arg
225 230 235 240

Leu Ser His Arg Lys Ala Leu Ile Thr Val Ile Ile Ala Leu Ile Ile
245 250 255

Phe Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Val Leu Arg Thr Leu His Leu
260 265 270

Leu Glu Trp Lys Ala Asp Lys Cys Lys Asp Arg Leu His Lys Ala Val
275 280 285

Ala Val Thr Leu Ala Leu Ala Ala Asn Ser Cys Phe Asn Pro Phe
290 295 300

Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg Leu Lys Ser Ala
305 310 315 320

Leu Arg Lys Gly Arg Pro Gin Lys Thr Arg Cys Gly Phe Ser Val Cys
325 330 335

Val Trp Leu Lys Lys Glu Thr Arg Val
340 345

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

atatgtctga tgccctgccaa

20

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 20

agtcatttgg agactatgag tg

22

<210> 21

<211> 1249

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (208)..(1134)

<400> 21

atatgtctga tgccctgccaa ggtcagaaga ggggtcgga gaaaacttgct tctcgccatg 60

tgagatggag tacggcaa at gtttgcac taatcaggaa gaaaagtggaa attgtatgaa 120

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gttaactttt gggtttattt cttttaaac taatataaag agaaaacttt atattatgtcc 180

ttgcctctgt ccaactccat attagaa atg gga gta act ggg acc ccc agc tat 234
Met Gly Val Thr Gly Thr Pro Ser Tyr

1 5

tat agt gac aag aac tgt aca ata gaa aac ttc aag agg gac ttt tac 282
Tyr Ser Asp Lys Asn Cys Thr Ile Glu Asn Phe Lys Arg Asp Phe Tyr

10 15 20 25

cct atc atc tac ctg ata ata ttt gtc tgg gga gcc ttg gga aat ggc 330
Pro Ile Ile Tyr Leu Ile Ile Phe Val Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly

30 35 40

ttt tcc ata tat gtc ttc cta cag act tac aag aag tcc aca tct gtg 378
Phe Ser Ile Tyr Val Phe Leu Gln Thr Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val

45 50 55

aat gtt ttc atg ctc aac ctg gcc att tca gat ttc cta ttc ata agc 426
Asn Val Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Phe Ile Ser

60 65 70

acc ctg ccc ttc agg gct gac tat aat ttc aga ggt tct gat tgg ata 474
Thr Leu Pro Phe Arg Ala Asp Tyr Asn Phe Arg Gly Ser Asp Trp Ile

75 80 85

ttt ggg gac tgg gcc tgc aga att atg tct tat tct tta tat gtc aac 522
Phe Gly Asp Trp Ala Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn

90 95 100 105

atg tat act agc att tat ttc cta act gtg ctg agt att gtg cgc ttc 570
Met Tyr Thr Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Ile Val Arg Phe

110 115 120

ctg gcc act gcc cac ccc ttc cag atg ctc cat atc acc agc gtt agg 618

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Ala Thr Ala His Pro Phe Gin Met Leu His Ile Thr Ser Val Arg

125

130

135

agt gcc tgg atc ctc tgt ggg att ata tgg gtc ttc atc atg gct tcc 666

Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly Ile Ile Trp Val Phe Ile Met Ala Ser

140

145

150

tca gga ctg ctt ctg aag cat ggc caa gag aag aaa aat aac act aca 714

Ser Gly Leu Leu Leu Lys His Gly Gin Glu Lys Lys Asn Asn Thr Thr

155

160

165

ttg tgc ttt gag ctg aat ctc caa aag ttt aaa aat ctc gtc atc ttg 762

Leu Cys Phe Glu Leu Asn Leu Gin Lys Phe Lys Asn Leu Val Ile Leu

170

175

180

185

aac tac att gca tta ggg gtg ggc ttc ttg ctt cca ttt ttc ata ctc 810

Asn Tyr Ile Ala Leu Gly Val Gly Phe Leu Leu Pro Phe Phe Ile Leu

190

195

200

acc atc tgc tac ctg ttg atc atc cgg gtc ttg tta aag gtg gag att 858

Thr Ile Cys Tyr Leu Leu Ile Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Ile

205

210

215

cca gaa tca ggt cca cgg gat gct cag agg aag gca ctg acc act atc 906

Pro Glu Ser Gly Pro Arg Asp Ala Gin Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile

220

225

230

gtc att gcc atg atc atc ttc ctc tgt ttt ctg cca tac cat gca 954

Val Ile Ala Met Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Ala

235

240

245

ctt cgg acc atc cac ttg gtc aca tgg gat gca gat tca tgt atg gat 1002

Leu Arg Thr Ile His Leu Val Thr Trp Asp Ala Asp Ser Cys Met Asp

250

255

260

265

gaa tta cat aag gcc acg gtc atc act ctg acc ttg gct gca gcc aac 1050

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Glu Leu His Lys Ala Thr Val Ile Thr Leu Thr Leu Ala Ala Asn

270 275 280

agc tgc ttc aat ccc ttt ctc tat tat ttt gct gga gag aat ttc aaa 1098

Ser Cys Phe Asn Pro Phe Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys

285 290 295

gca cga tta agg gct ata ttc agc aaa gat cat cta tagaaagcaa 1144

Ala Arg Leu Arg Ala Ile Phe Ser Lys Asp His Leu

300 305

agtcaaaagtg cagccttcctt atttgtgtat tactgaagac cagagtttaag agcataaggg 1204

gctgttctgg aggtacgctc atgaacactg gtgtccaccc tcaact 1249

<210> 22

<211> 309

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 22

Met Gly Val Thr Gly Thr Pro Ser Tyr Tyr Ser Asp Lys Asn Cys Thr

1 5 10 15

Ile Glu Asn Phe Lys Arg Asp Phe Tyr Pro Ile Ile Tyr Leu Ile Ile

20 25 30

Phe Val Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly Phe Ser Ile Tyr Val Phe Leu

35 40 45

Gln Thr Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Phe Met Leu Asn Leu

50 55 60

Ala Ile Ser Asp Phe Leu Phe Ile Ser Thr Leu Pro Phe Arg Ala Asp

65 70 75 80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tyr Asn Phe Arg Gly Ser Asp Trp Ile Phe Gly Asp Trp Ala Cys Arg

85

90

95

Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn Met Tyr Thr Ser Ile Tyr Phe

100

105

110

Leu Thr Val Leu Ser Ile Val Arg Phe Leu Ala Thr Ala His Pro Phe

115

120

125

Gln Met Leu His Ile Thr Ser Val Arg Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly

130

135

140

Ile Ile Trp Val Phe Ile Met Ala Ser Ser Gly Leu Leu Leu Lys His

145

150

155

160

Gly Gln Glu Lys Lys Asn Asn Thr Thr Leu Cys Phe Glu Leu Asn Leu

165

170

175

Gln Lys Phe Lys Asn Leu Val Ile Leu Asn Tyr Ile Ala Leu Gly Val

180

185

190

Gly Phe Leu Leu Pro Phe Phe Ile Leu Thr Ile Cys Tyr Leu Leu Ile

195

200

205

Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Ile Pro Glu Ser Gly Pro Arg Asp

210

215

220

Ala Gln Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Val Ile Ala Met Ile Ile Phe

225

230

235

240

Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Ala Leu Arg Thr Ile His Leu Val

245

250

255

Thr Trp Asp Ala Asp Ser Cys Met Asp Glu Leu His Lys Ala Thr Val

260

265

270

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ile Thr Leu Thr Leu Ala Ala Ala Asn Ser Cys Phe Asn Pro Phe Leu

275

280

285

Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Ala Arg Leu Arg Ala Ile Phe

290

295

300

Ser Lys Asp His Leu

305

<210> 23

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 23

gggtctagaa tggagagaaa acttatgtcc ttacttc

37

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 24

ccctctagac tattacactc tcgtttccctt tttcagccac

40

THIS PAGE BLANK (USPTO)

【図面の簡単な説明】図 1 は、LTC4 受容体に対する[3H]-LTC4 の特異的結合の飽和曲線を示すグラフである。図中、縦軸はタンパク質 1mg 当たりの[3H]-LTC4 結合量(fmol)を、横軸は反応液中の[3H]-LTC4 濃度 nM を示す。図 2 は、LTC4 受容体に対する[3H]-LTC4 の特異的結合の Scatchard 分析の結果を示す。図中、縦軸は結合率(結合/フリー比)を、横軸はタンパク質 1mg 当たりの[3H]-LTC4 結合量(fmol)を示す。図 3 は、細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇に対する LTC4 の用量依存性の結果を示す。図中、縦軸は蛍光強度の最高値(counts)を、横軸は反応液中の LTC4 濃度(logM)を示す。図 4 は、組織におけるヒト LTC4 受容体の遺伝子発現分布をノーザンプロットハイブリダイゼーション法によって解析した結果を示す写真である。図 5 は、心血管系におけるヒト LTC4 受容体の遺伝子発現分布を PCR 法によって解析した結果を示す写真である。図 6 は、LTC4 受容体発現 CHO 細胞の細胞遊走に対する LTC4 の用量依存性の結果を示す。図中、縦軸は吸光度(595nm)を、横軸は反応液中の LTC4 濃度(-logM)を示す。図 7 は、LTC4 による細胞遊走に対する化合物 A の用量依存的阻害の結果を示す。図中、縦軸は化合物なしのコントロールにおける吸光度(%)を、横軸は反応液中の化合物 A の濃度(μM)を示す。図 8 は、LTC4 による冠動脈平滑筋細胞の細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇に対する化合物 A の用量依存的阻害の結果を示す。図中、縦軸は蛍光強度を、横軸は時間を示す。また、細胞内 Ca^{++} 濃度の変化のタイムコースの内容については矢印で示す。

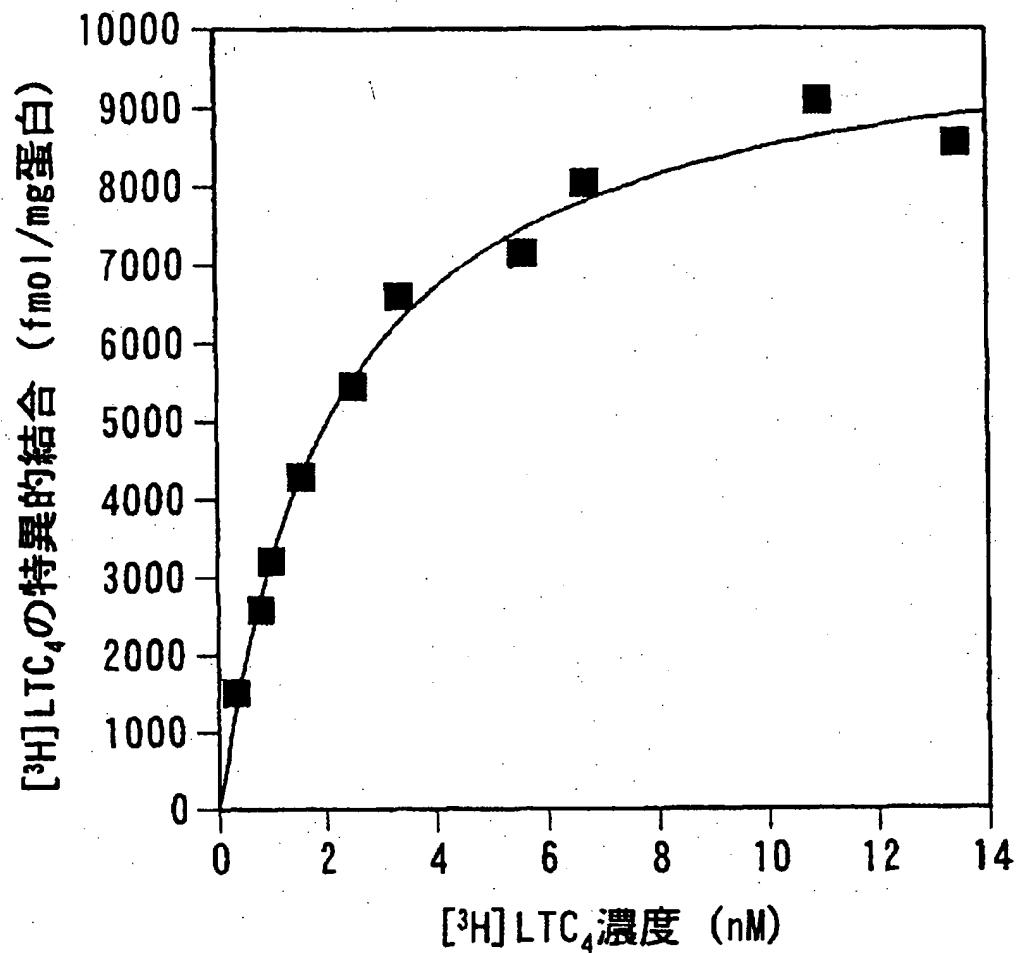
{simple explanation of drawing } Figure 1 confronts LTC4 receptor, [3 H] it is a graph which -LTC4 shows saturated curve of specific binding. in the diagram, vertical axis [3 H] -LTC4 bound amount (fmol) per protein 1 mg, in reaction mixture [3 H] -LTC4 concentration nM shows the horizontal axis. Figure 2 confronts LTC4 receptor, [3 H] -LTC4 result of Scatchard analysis of specific binding is shown. As for in the diagram, vertical axis bonding ratio (Connection /free ratio), as for horizontal axis [3 H] -LTC4 bound amount (fmol) per protein 1 mg is shown. Figure 3 shows result of dose dependency of LTC4 for rise of intracellular Ca^{++} concentration. As for in the diagram, vertical axis maximum value (counts) of fluorescence intensity, as for horizontal axis LTC4 concentration (logM) in reaction mixture is shown. As for Figure 4, it is a photograph which shows result of analyzing gene expression distribution of human LTC4 receptor in organization with Northern blot hybridization method . As for Figure 5, it is a photograph which shows result of analyzing gene expression distribution of human LTC4 receptor in cardiovascular with PCR method . Figure 6 shows result of dose dependency of LTC4 for cell chemotaxis of LTC4 receptor expression CHOcell. As for in the diagram, vertical axis absorbance (595 nm), as for horizontal axis LTC4 concentration (-logM) in the reaction mixture is shown. Figure 7 shows result of dose dependent inhibition of compound A for cell chemotaxis with LTC4 . As for in the diagram, vertical axis when designating absorbance in controlling compound none as 100%, absorbance (%), horizontal axis shows concentration (μM) of compound A in reaction mixture. Figure 8 shows result of dose dependent inhibition of compound A for rise of intracellular Ca^{++} concentration of coronary artery smooth muscle cell with LTC4 . As for in the diagram, vertical axis fluorescence intensity, as for horizontal axis time is shown. In addition, it shows with arrow concerning content of thyme course of change of intracellular Ca^{++} concentration.

Drawings

【図1】

【Figure 1】

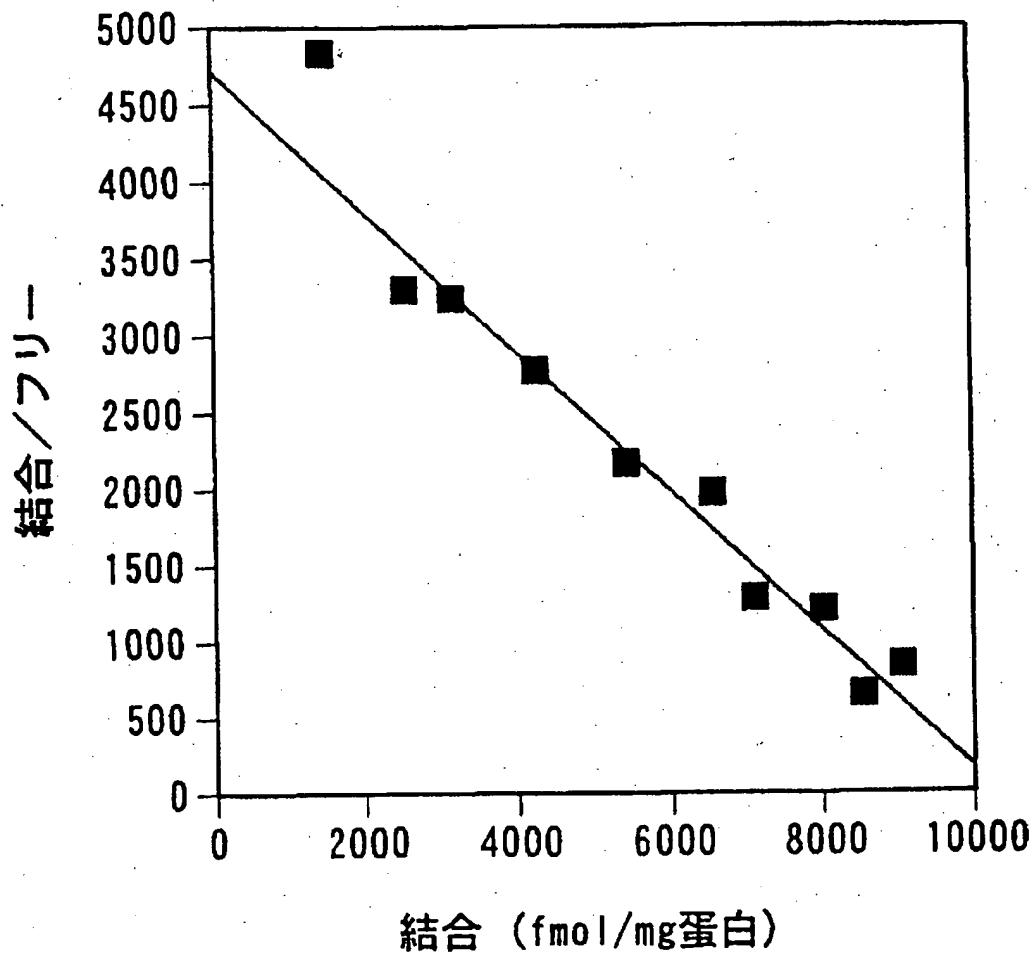
THIS PAGE BLANK (USPTO)



【図2】

[Figure 2]

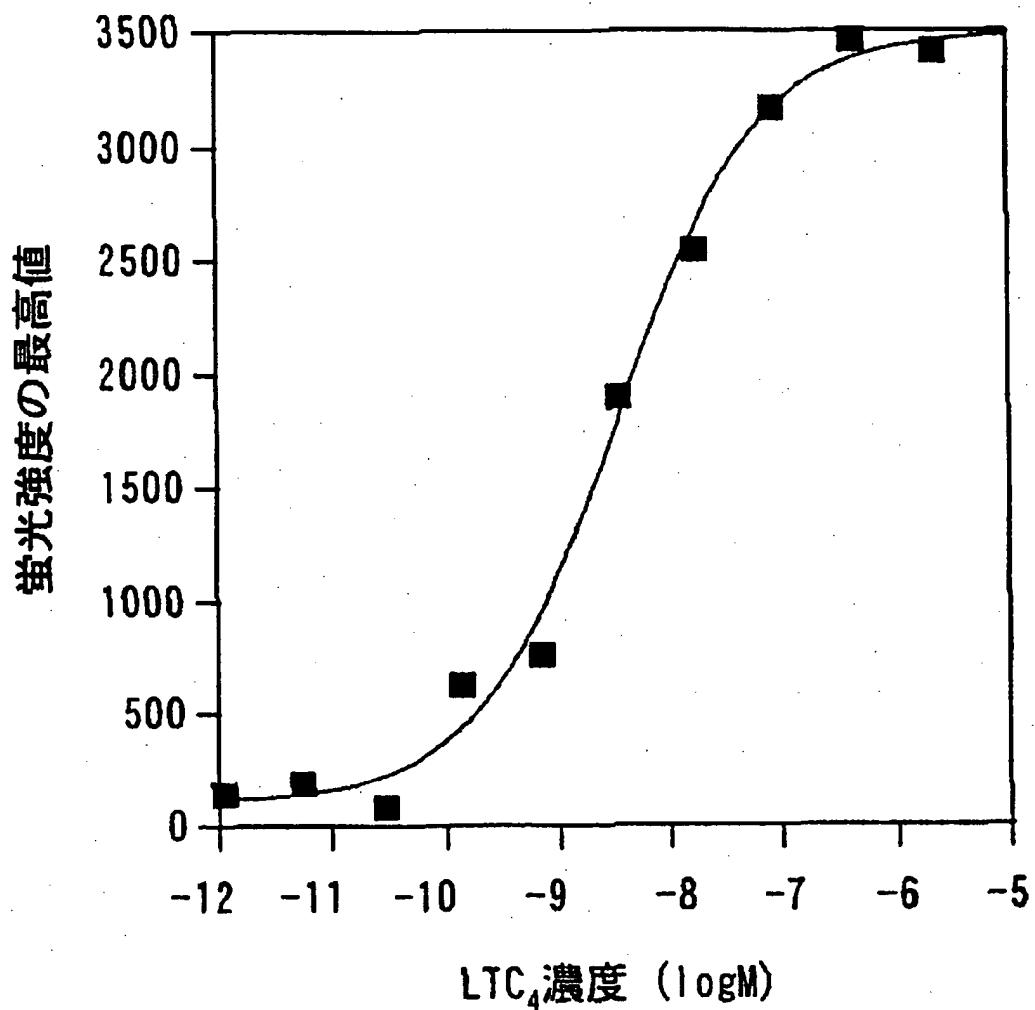
THIS PAGE BLANK (USPTO)



【図3】

[Figure 3]

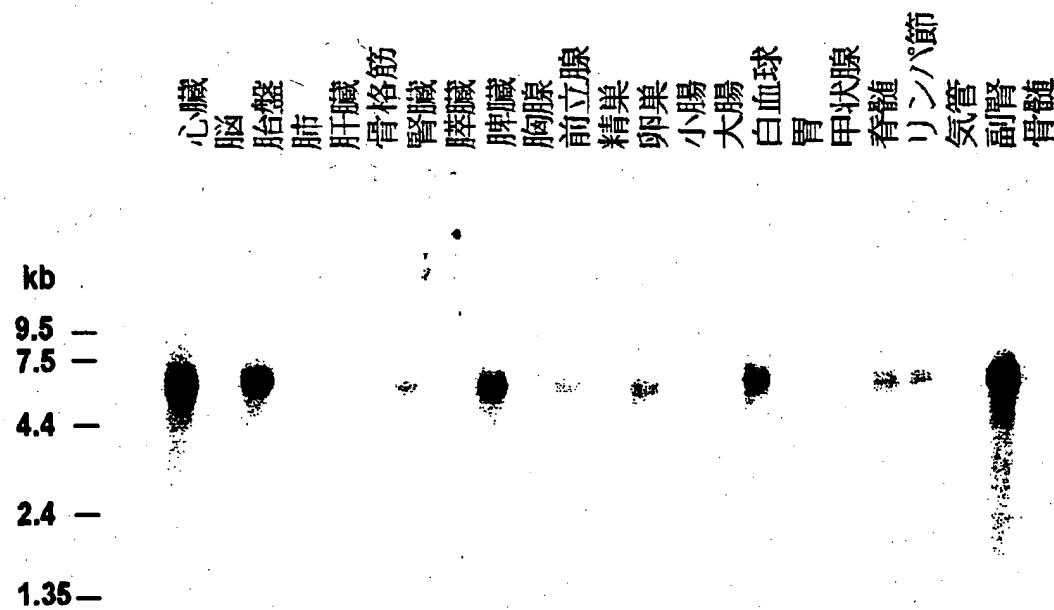
THIS PAGE BLANK (USPTO)



【図4】

[Figure 4]

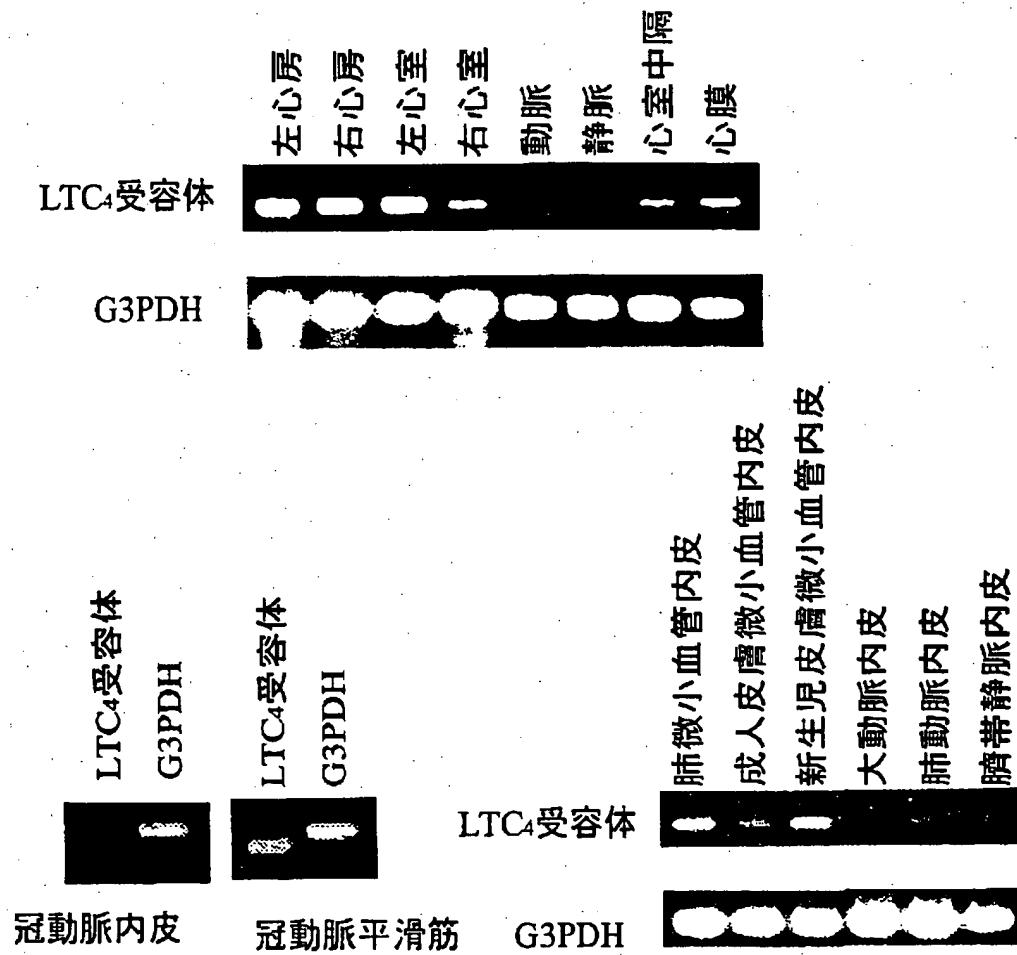
THIS PAGE BLANK (USPTO)



【図5】

[Figure 5]

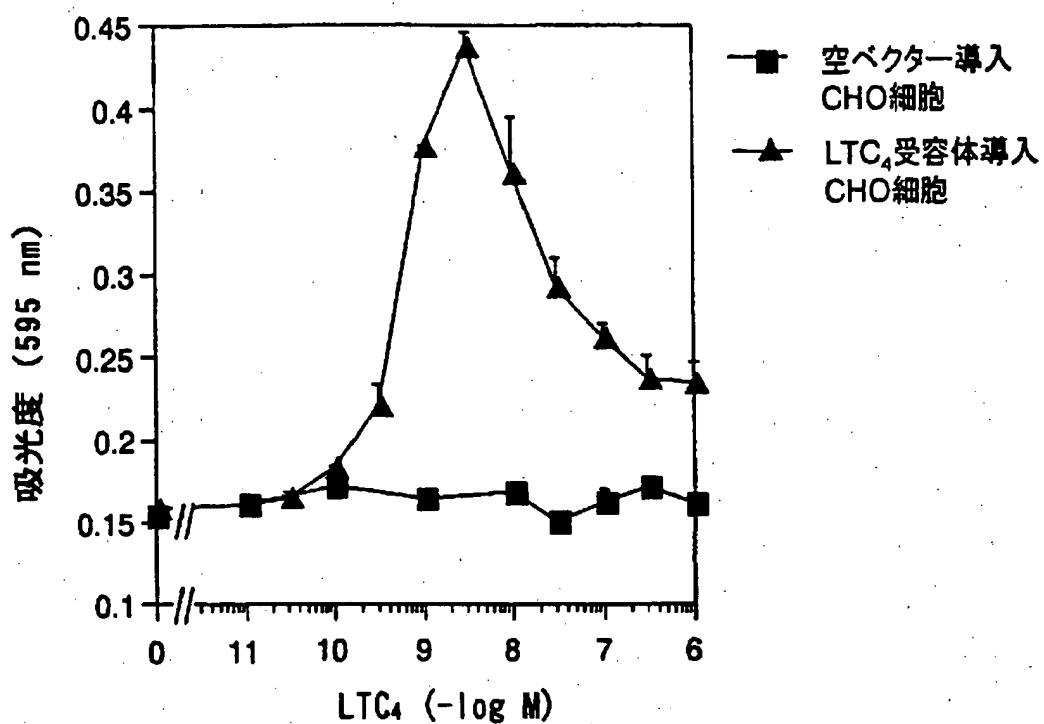
THIS PAGE BLANK (USPTO)



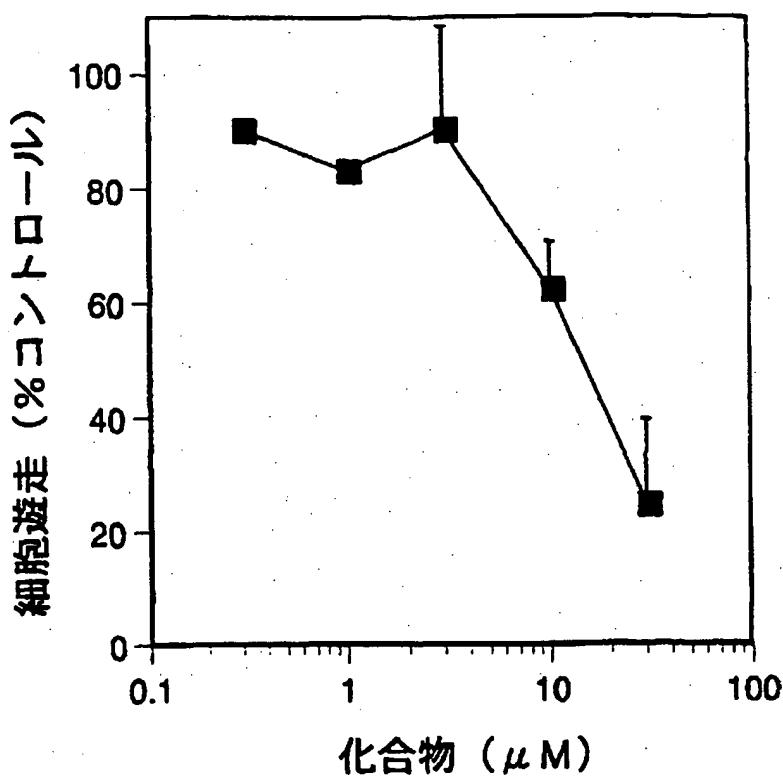
【図6】

[Figure 6]

THIS PAGE BLANK (USPTO)



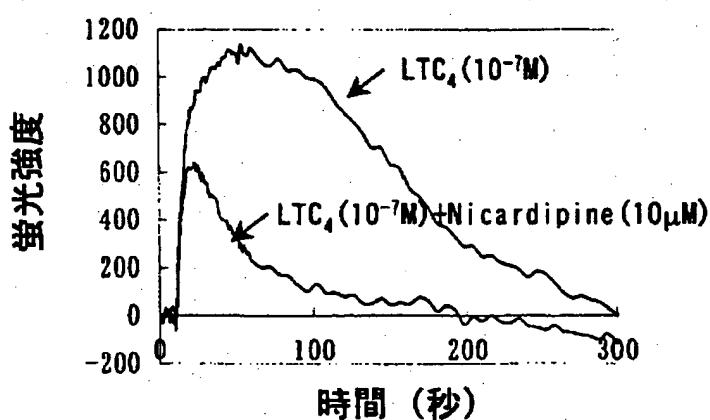
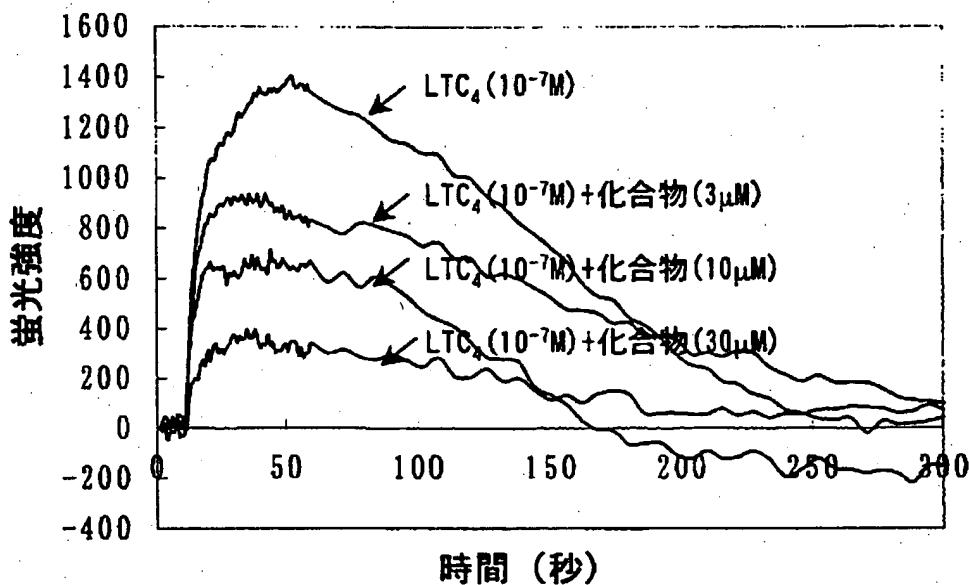
THIS PAGE BLANK (USPTO)



【図8】

[Figure 8]

THIS PAGE BLANK (USPTO)



【手続補正書】【提出日】

平成 14 年 4 月 8 日(2002.4.8)

Heisei 14 year April 8 day (2002.4.8)

【手続補正1】【補正対象書類名】

明細書

Specification

【補正対象項目名】

特許請求の範囲

Claims

【補正方法】

変更

Modification

THIS PAGE BLANK (USPTO)

【補正の内容】【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列番号:2、配列番号:18、および配列番号:22 のいずれかに記載のアミノ酸配列、または配列番号:2、配列番号:18、および配列番号:22 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1 のアミノ酸が欠失、付加、挿入および/または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を含み、ロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質。

【請求項 2】配列番号:1、配列番号:17、および配列番号:21 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジメントな条件下でハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、ロイコトリエン C4 受容体活性を有するタンパク質。

【請求項 3】請求項 1、または請求項 2 に記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 4】請求項 3 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 5】請求項 4 に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載のタンパク質を製造する方法。

【請求項 6】請求項 1 または請求項 2 に記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項 7】次の工程を含む、被験化合物のロイコトリエン C4 受容体活性を修飾する活性の検出方法。

a)ロイコトリエン C4 受容体のリガンドの存在下で請求項 1 または 2 に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程。

b)ロイコトリエン C4 受容体活性の変化を測定する工程

【請求項 8】次の工程を含むロイコトリエン C4 受容体活性を修飾する物質のスクリーニング方法。

a)ロイコトリエン C4 受容体のリガンドの存在下で請求項 1 または 2 に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程。

b)ロイコトリエン C4 受容体活性の変化を測定する工程

c)ロイコトリエン C4 受容体活性を修飾する物質を選択する工程

{content of correction } {Claims }

protein, where amino acid of 1 is deficient in {Claim 1 } Sequence Number:2、 Sequence Number:18、 and the amino acid sequence, which is stated in any of Sequence Number:22 or amino acid sequence which is stated in any of Sequence Number:2、 Sequence Number:18、 and Sequence Number:22, is decorated by substitution includes amino acid sequence which with addition and insertion and/or other amino acid, possesses leucotriene C4 receptor activity

Under DNA and stringent condition which consist of {Claim 2 } Sequence Number:1、 Sequence Number:17、 and the nucleotide sequence which is stated in any of Sequence Number:21 hybridize DNA which is done cord with protein which is done, protein, which possesses leucotriene C4 receptor activity

DNA, which protein which is stated in {Claim 3 } Claim 1, or Claim 2 cord is done

DNA which is stated in {Claim 4 } Claim 3 revelation transformed host, which possibly is kept

method, which produces protein where it cultures transformed host which is stated in {Claim 5 } Claim 4, expressed product includes step which recovers, states in Claim 1 or Claim 2

antibody, for protein which is stated in {Claim 6 } Claim 1 or Claim 2

detection method, of activity which {Claim 7 } includes following step, decorates leucotriene C4 receptor activity of compound being tested

protein, which under existing of ligand of a)leucotriene C4 receptor is stated in Claim 1 or 2 or transformed cell and compound being tested which reveal this protein step, which contacts

step which measures change of b)leucotriene C4 receptor activity

{Claim 8 } screening method, of substance which decorates leucotriene C4 receptor activity which includes the following step

protein, which under existing of ligand of a)leucotriene C4 receptor is stated in Claim 1 or 2 or transformed cell and compound being tested which reveal this protein step, which contacts

step which measures change of b)leucotriene C4 receptor activity

step which selects substance which decorates c)leucotriene C4 receptor activity

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO2001019986A1

2003-4-2

<DP N=0079><TXF FR=0001 HE=008 WI=152 LX=0300 LY=0300>【國際調查報告】<EMI
ID=000035 HE=204 WI=141 LX=0350 LY=0385><DP N=0080><EMI ID=000036 HE=204 WI=139
LX=0360 LY=0300>

THIS PAGE BLANK (version 0)

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月22日 (22.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/19986 A1

(51) 国際特許分類7:
C12N 15/12, C07K
14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/02, A61K 31/422,
A61P 43/00, 9/08, C07D 413/12

(21) 国際出願番号:
PCT/JP00/06265

(22) 国際出願日:
2000年9月13日 (13.09.2000)

(25) 国際出願の言語:
日本語

(26) 国際公開の言語:
日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/259986 1999年9月14日 (14.09.1999) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 山之内
製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋
本町2丁目3番11号 Tokyo (JP). 株式会社ヘリックス
研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒
292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3 Chiba (JP).

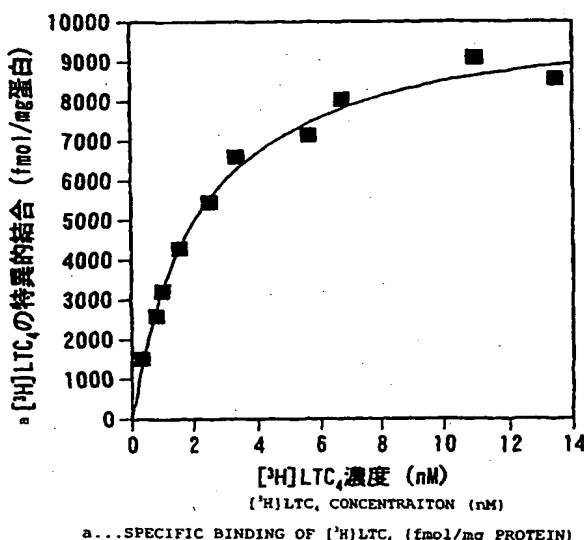
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 高崎 淳
(TAKASAKI, Jun) [JP/JP]. 蒲原正純 (KAMOHARA,
Masazumi) [JP/JP]. 松本光之 (MATSUMOTO, Mit-
suyuki) [JP/JP]. 斎藤 哲 (SAITO, Tetsu) [JP/JP]; 〒
305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株
式会社内 Ibaraki (JP). 杉本 貴 (SUGIMOTO, Tohru)
[JP/JP]; 〒174-8612 東京都板橋区蓮根3-17-1 山之内

(統葉有)

(54) Title: PEPTIDE LEUKOTRIENE RECEPTOR

(54) 発明の名称: ペプチドロイコトリエン受容体



(57) Abstract: A cDNA encoding a novel LTC₄ receptor is isolated. Provision of the LTC₄ receptor which is a novel protein, enables binding experiments with the use of LTC₄. By screening a compound modifying the activity of the LTC₄ receptor on the basis of these binding experiments, it becomes possible to develop drugs targeting the LTC₄ receptor.

(57) 要約:

WO 01/19986 A1

新規 LTC₄受容体タンパク質をコードする cDNA を単離した。新規タンパク質である LTC₄受容体の提供により、LTC₄を用いた結合実験が可能となった。結合実験に基づく LTC₄受容体の活性を修飾する化合物のスクリーニングによって、LTC₄受容体を標的とする医薬開発が可能となる。



製薬株式会社内 Tokyo (JP). 太田紀夫 (OTA, T shio) [JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-7-105 Kanagawa (JP). 磯貝隆夫 (ISOGAI, Takao) [JP/JP]; 〒300-0303 茨城県稻敷郡阿見町大室511-12 Ibaraki (JP). 西川哲夫 (NISHIKAWA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒173-0013 東京都板橋区氷川町27-3-403 Tokyo (JP). 河合弓利 (KAWAI, Yuri) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那4508-19-201 Chiba (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,

MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, JE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

- 1 -

明細書

ペプチドロイコトリエン受容体

技術分野

本発明は、新規なペプチドロイコトリエン受容体タンパク質、この新規なタンパク質をコードしている DNA、該 DNA を含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換細胞及び該細胞を使用した薬物スクリーニング法に関する。

背景技術

プロスタグランジンやトロンボキサン、ロイコトリエンのようなエイコサノイドはアラキドン酸の代謝産物の一つのファミリーであり、生体のホメオスタシスを維持するために様々な生理作用を発揮している（講座プロスタグランジン 1～8、鹿取信、室田誠逸、山本尚三 編（1988）参照）。それらの生理作用はそれらのエイコサノイドに特有の細胞膜受容体を介して発現すると考えられている。エイコサノイドの一つであるロイコトリエンは、アラキドン酸の 5-リボキシゲナーゼ系の代謝産物の中で低濃度で強い生理活性を示す一連の生理活性脂質である（Samuelsson, B. et al. (1987) *Science*. 237, 1171-1176）。

ロイコトリエン類はロイコトリエン B₄ (LTB₄) と、脂肪酸にペプチドが結合したペプチドロイコトリエンの二つに大別される。後者のペプチドロイコトリエンとしては、ロイコトリエン C₄ (LTC₄)、ロイコトリエン D₄ (LTD₄)、およびロイコトリエン E₄ (LTE₄) が知られている。LTB₄ は白血球の強力な活性化因子であり、炎症免疫反応や感染防御などで重要な役割を果たしている (Chen, X. S. et al. (1994) *Nature* 372, p179-182)。一方、LTC₄、LTD₄、およびLTE₄ は、気道平滑筋をはじめとする種々の平滑筋の収縮、気道の粘膜分泌亢進、細動静脈の収縮、血清成分の漏出などの作用を持っている (Taylor, G. W. et al. (1986) *Trends*

Pharmacol. Sci. 7, p100-103)。このような作用から、ペプチドロイコトリエンは、炎症やアレルギー性症状、例えば喘息や気管支炎やアレルギー性鼻炎などの呼吸器疾患、乾せんや皮膚炎などの皮膚疾患、inflammatory bowel disease や潰瘍性大腸炎などの腸疾患、の発症、進展、増悪に関与していると考えられている(鹿取信、室田誠逸、山本尚三 編 (1988) 講座プロスタグランジン 3, 225-227, 484-486, Piper, P. J. et al. (1984) Physiol. Rev. 64. 744-761, Taylor, G. W. et al. (1986) Trends Pharmacol. Sci. 7. 100-103, Lewis, R. A. et al. (1990) N. Engl. J. Med. 323. 654-655)。また、ペプチドロイコトリエン (LTC₄ および LTD₄) は心収縮力や冠血流量の著明な低下をもたらすことが知られており(鹿取信、室田誠逸、山本尚三 編 (1988) 講座プロスタグランジン 2, 64-70, Piper, P. J. et al. (1984) Physiol. Rev. 64. 744-761, Letts, L.G. et al., (1982) Br.J. Pharmacol. 76, 169-176, Chiono, M. et al., (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther. 256, 1042-1048)、心臓血管障害との関連が指摘されている。

以上のことから、ロイコトリエン類の受容体の構造および性質を明らかにすることはロイコトリエン類の生理的役割の解明、引いては、ロイコトリエン類の関与する疾患の解明、治療法の発見等につながるものと考えられる。

現在までに、IUPHAR (International union of Pharmacology) によって、ロイコトリエンの受容体は薬理学的に BLT 受容体、CysLT1 受容体、および CysLT2 受容体の 3 つに分類されている(Alexander, S. P. H. et al. (1997) Trends Pharmacol. Sci. (Suppl.) 50-51)。

BLT 受容体は、LTB₄ を特異的に認識する受容体である。CysLT1 受容体と CysLT2 受容体は、いずれもペプチドロイコトリエンを認識する受容体である。CysLT1 受容体が、既存の古典的 LTD₄ 受容体拮抗薬 (ICI204219、MK476、SR2640、SKF104353、LY170680 等) でその生物作用が遮断されるのに対して、CysLT2 受容体は遮断されない。その他、CysLT1 受容体や CysLT2 受容体とは異なるペプチドロイコトリエン受容体の存在を示唆する報告も有る (Jonsson, E. W. et al. (1998) Eur. J.

Pharmacol. 357, 203-211)。

ロイコトリエン受容体遺伝子としては、BLT受容体がヒト (Yokomizo, T. et al. (1997) Nature 387, 620-624)、マウス (Martin, V. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 8597-8603) で単離同定されている。また、最近、CysLT1受容体がヒトで単離同定され、LTD₄が親和性の高いリガンドであることが判明した。 (Lynch, K. R. et al. (1999) Nature 399, 789-793)。しかしながら現時点では、CysLT1受容体以外のペプチドロイコトリエンの受容体、とくに、LTC₄に親和性の高い受容体の遺伝子は如何なる種においても単離同定されていない。

さらには、これまで、抗炎症薬を目指して BLT受容体の拮抗薬 (Negro, J. M. et al. (1997) Allergol. Immunopathol. Madr. 25, 104-112, Kishikawa, K. et al. (1995) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res. 23, 279-281) や CysLT1受容体の拮抗薬 (Leff, J. A. et al. (1998) N. Engl. J. Med. 339, 147-152, Suisa, S. et al. (1997) Amm. Int. Med. 126, 177-183, Grossman, J. et al. (1997) J. Asthma 34, 321-328) が研究開発されている。

一方、ロイコトリエン受容体のなかでも特に LTC₄に親和性の高い受容体については、拮抗薬、作動薬の研究開発は進んでいない (Gardiner, P. J. et al. (1994) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res. 22, 49-61, Capra, V. et al. (1998) Mol. Pharmacol. 53, 750-758)。LTC₄と受容体との結合が、Glutathione S-transferase や LTC₄ Synthase のような細胞や組織が持つ親和性の低い LTC₄結合タンパク質にマスクされてしまうため、細胞や組織標本を用いた結合実験が困難なことが主な原因である。したがって、インビトロでの結合実験を可能とする LTC₄受容体の提供が望まれている。

発明の開示

本発明の課題は、ヒトの LTC₄受容体または該受容体と同等の機能を有するタンパク質と、それをコードする遺伝子の提供である。また本発明は、LTC₄受容体タ

ンパク質を使用したペプチドロイコトリエン受容体を標的とする薬物として有用な化合物のスクリーニング法の提供をも課題としている。

本発明者らは、 LTC_4 受容体をコードするDNAの単離のために、ヒト全長cDNAライブラリーの利用が有効なのではないかと考えた。 LTC_4 受容体タンパク質の単離が望まれながら、これまで達成できていないことから、まったく新しいアプローチを試みることには意義がある。特に、タンパク質コード領域を確実に含む全長cDNAライブラリーを用いることにより、未知のタンパク質の単離を迅速に達成できると考えた。翻訳開始コドンを備えた全長cDNAを細胞に導入すれば、容易にタンパク質の機能を確認できるためである。

本発明者らは、まずオリゴキャップ法 [K. Maruyama and S. Sugano, *Gene*, 138: 171-174 (1994); Y. Suzuki et al., *Gene*, 200: 149-156 (1997)]によって全長率の高いヒトcDNAライブラリーを合成した。次いでこのcDNAライブラリーから単離したクローニングからヒト全長cDNAをクローニングした。更にこうして得られた全長cDNAクローニングの中から、膜受容体をコードすると推定されるcDNAを選択するために、シグナル配列、あるいは膜貫通領域を含むアミノ酸配列をコードするcDNAクローニングを選択した。こうして絞り込まれたcDNAクローニングの中に、COS細胞に形質転換することによってロイコトリエンC4(LTC_4)受容体活性を有するタンパク質をコードするcDNAを確認した。更に、このcDNAによってコードされるタンパク質を用いて LTC_4 受容体の活性を修飾する化合物のスクリーニングが可能となることを見出した。更に、このcDNAのブタとラットにおけるホモログを単離し、それらがいずれも LTC_4 受容体活性を有するタンパク質をコードしていることを明らかにした。また本発明の受容体は LTC_4 受容体活性のみならず、 LTD_4 受容体活性をも併せ持つことを明らかにし、本発明を完成了。

すなわち本発明は、以下のタンパク質、このタンパク質をコードするDNA、並びにそれらの用途に関する。

〔1〕配列番号：2、配列番号：18、および配列番号：22のいずれかに記載

- 5 -

のアミノ酸配列、または配列番号：2、配列番号：18、および配列番号：22のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を含み、ロイコトリエンC₄受容体活性を有するタンパク質。

〔2〕 配列番号：1、配列番号：17、および配列番号：21のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、ロイコトリエンC₄受容体活性を有するタンパク質。

〔3〕 〔1〕、または〔2〕に記載のタンパク質をコードするDNA。

〔4〕 〔3〕に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

〔5〕 〔4〕に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、〔1〕または〔2〕に記載のタンパク質を製造する方法。

〔6〕 〔1〕または〔2〕に記載のタンパク質に対する抗体。

〔7〕 次の工程を含む、被験化合物のロイコトリエンC₄受容体活性を修飾する活性の検出方法。

a) ロイコトリエンC₄受容体のリガンドの存在下で〔1〕または〔2〕に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、

b) ロイコトリエンC₄受容体活性の変化を測定する工程

〔8〕 次の工程を含むロイコトリエンC₄受容体活性を修飾する物質のスクリーニング方法。

a) ロイコトリエンC₄受容体のリガンドの存在下で〔1〕または〔2〕に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、

b) ロイコトリエンC₄受容体活性の変化を測定する工程

c) ロイコトリエンC₄受容体活性を修飾する物質を選択する工程

- 6 -

[9] [1]、または[2]に記載のロイコトリエンC₄受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む抗炎症用、または抗アレルギー用医薬組成物。

[10] [1]、または[2]に記載のロイコトリエンC₄受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む血管拡張用医薬組成物。

あるいは本発明は、[1]または[2]に記載のロイコトリエンC₄受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む抗炎症用医薬組成物、抗アレルギー用医薬組成物、あるいは血管拡張用医薬組成物の製造における使用に関する。

更に本発明は、[8]に記載のスクリーニング方法によって得ることができる、[1]または[2]に記載のロイコトリエンC₄受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストに関する。加えて本発明は、[8]に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物の、[1]または[2]に記載のロイコトリエンC₄受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストとしての使用に関する。

本発明は、LTC₄受容体タンパク質に関する。本発明のタンパク質は、全長cDNAライブラリーを構成する全長cDNAのクローンから選択されたcDNAによってコードされるタンパク質である。また本発明のタンパク質は、本発明において明らかにされたヒト全長cDNAの塩基配列情報に基づいて単離された、ブタおよびラットにおけるホモログである。GenBankやSwissProtの検索結果によれば、配列番号：1に示す塩基配列（約2.8kb）と、この塩基配列によってコードされる推定アミノ酸配列（配列番号：2／346アミノ酸残基）は新規である。またこのタンパク質のブタおよびラットにおけるホモログとして単離されたタンパク質のアミノ酸配列、並びにそれをコードする塩基配列も新規である。ブタに由来するタンパク質のアミノ酸配列は配列番号：18に、またそのcDNAの塩基配列を配列番号：17に示した。またラットに由来するタンパク質のアミノ酸配列は配列番号：2

2に、またその cDNA の塩基配列を配列番号：19に示した。本発明の LTC₄受容体タンパク質を構成するアミノ酸配列は、公知のヒト CysLT1 受容体とは 31%、ヒト BLT 受容体とは 20% の相同性を有していた。一方、ブタとラットに由来するタンパク質とヒトのタンパク質を比較すると、次に示すような構造的な類似が見られた。

アミノ酸残基 ヒトとの相同性

ヒト	346	—
ブタ	345	77.7%
ラット	309	72.6%

更にブタとラットに由来するタンパク質においても、本発明のタンパク質と同様に LTC₄受容体活性が確認された。これらの事実に基づいて、本発明において単離されたこれらのタンパク質は、いずれもヒト LTC₄受容体のホモログであると考えられた。本発明のタンパク質やその遺伝子、また、本発明のタンパク質の活性を調節する化合物は、LTC₄やその受容体が関与する疾患の予防や治療への応用が考えられる。

前述のとおり、LTC₄および LTD₄等のペプチドロイコトリエン類は、喘息、気管支炎、あるいはアレルギー性鼻炎などの呼吸器疾患、乾せんや皮膚炎などの皮膚疾患、inflammatory bowel disease や潰瘍性大腸炎などの腸疾患、などの発症、進展、増悪に関与していると考えられている。また、ペプチドロイコトリエン (LTC₄ および LTD₄) は、心臓血管障害との関連も指摘されている。したがって、本発明によって提供される LTC₄受容体は、これらの疾患や症状において重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、その活性を修飾する化合物は、これらの疾患の治療および/または予防のための医薬品として有用である。たとえば LTC₄受容体と LTC₄の結合に干渉し、LTC₄受容体に刺激を伝達しない化合物は、LTC₄のアンタゴニスト（遮断薬）として作用する。このような化合物は、LTC₄受容体を介する疾患の治療や予防に有用である。また本発明の受容体は、LTD₄受容体活性

も有するため、本受容体のアンタゴニストは LTD_4 受容体のアンタゴニストとしても作用する。したがって、前記の LTC_4 と LTD_4 の両者が関与する疾患の、より良い治療薬や予防薬となりうる。

本発明のタンパク質は、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質は、例えば、後述するように本発明の DNA を挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したタンパク質を精製することにより調製することが可能である。あるいはインビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M. C., Jackson, R.J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照）などによって、本発明のタンパク質を調製することも可能である。一方、天然のタンパク質は、例えば、後述する本発明のタンパク質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wiley & Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

また本発明には、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質のみならず、1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる、またはこれらを含むタンパク質であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が配列番号：2 からなるタンパク質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。配列番号：2 からなるタンパク質が持つ生物学的特性とは、 LTC_4 の受容体として機能することに他ならない。本発明における LTC_4 受容体活性とは、 LTC_4 との結合親和性を備え、 LTC_4 との結合によって LTC_4 用量依存的に細胞内における Ca^{++} 濃度の上昇をもたらすことと定義される。本発明における LTC_4 との結合

親和性とは、望ましくは解離定数 $K_d = 30 \text{ nM}$ 以下、より望ましくは $K_d = 5 \text{ nM}$ 以下の高い結合親和性を示す場合、そのタンパク質が LTC_4 との結合親和性を有すると言つてよろしい。

更に本発明のタンパク質と同等の生物学的特性を有するタンパク質は、望ましくは LTD_4 受容体活性を有する。 LTD_4 受容体活性とは、 LTD_4 との結合親和性を備え、 LTD_4 との結合によって LTD_4 用量依存的に細胞内における Ca^{++} 濃度の上昇をもたらすことと定義される。

タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の 10% 以内であり、好ましくは全アミノ酸の 5% 以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の 1% 以内である。

本発明に基づいて、本発明のタンパク質の部分ペプチド断片を得ることができる。たとえば本発明のタンパク質の競合阻害剤として機能する、リガンドとの結合能を有する部分ペプチド断片が提供される。また、抗体調製のための抗原ペプチドを得ることもできる。部分ペプチド断片が本発明のタンパク質に特異的であるためには、配列番号：2 に記載されたアミノ酸配列から選択された連続する少なくとも 7 アミノ酸、好ましくは 8 アミノ酸以上、より好ましくは 9 アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。本発明の部分ペプチド断片は、本発明のタンパク質に対する抗体や本発明のタンパク質の競合阻害剤の調製以外に、例えば、本発明のタンパク質に結合するリガンドのスクリーニングなどに利用し得る。本発明の部分ペプチド断片は、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードする DNA に関する。本発明の DNA としては、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、その形態特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA なども含まれる。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配

- 10 -

列を有する DNA が含まれる。このような塩基配列は、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定することができる(Crantham, R. et al.(1981) Nucleic Acids Res., 9 r43-r74)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis)(Mark, D. F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666)等にしたがって改変することができる。

本発明の DNA は、配列番号：2 からなるタンパク質をコードする DNA 配列（配列番号：1）もしくはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら DNA 配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。たとえば本発明の LTC₄ 受容体タンパク質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から抽出した mRNA を鑄型として cDNA を合成し、ベクターに組み込んで cDNA ライブラリーとする。本発明の LTC₄ 受容体の産生能力を有する細胞あるいは組織としては、例えばヒトの脾臓を用いることができる。このライブラリーを、配列番号：1 に基づいて設定したプローブを使ったコロニーハイブリダイゼーションやブラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングすることにより、目的とする cDNA のクローニングが可能である。

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wiley & Sons Section 6.3-6.4) を用いて配列番号：2 からなるタンパク質をコードする塩基配列（配列番号：1）またはその一部をもとにこれと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を得ることは、通常行いうことである。このように得られた DNA は本発明に含まれる。

機能的に同等なタンパク質をコードする遺伝子を単離する生物としては、ヒト以外に、例えばラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられる

が、これらに制限されない。

機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、通常、洗浄条件として「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同意を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される本発明の DNA がコードするタンパク質は、通常、配列番号：2 からなるタンパク質とアミノ酸配列において高い相同意を有する。高い相同意とは、少なくとも 60% 以上、好ましくは 70% 以上の配列の同一性を指す。あるいは本発明における高い相同意とは、特に望ましくは 90% 以上、より望ましくは 95%、更に望ましくは 99% 以上の同一性を指す。相同意の特定は、BLAST 検索アルゴリズムを用いて決定することができる。

また、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を用いて配列番号：2 からなるタンパク質をコードする DNA 配列（配列番号：1）の一部をもとにプライマーを設計し、配列番号：2 からなるタンパク質をコードする DNA 配列またはその一部と相同意の高い DNA 断片を単離することも可能である。

このようにして得られた、配列番号：1 の塩基配列と相同意の高い塩基配列からなる DNA によってコードされるタンパク質について、LTC₄ 受容体活性を確認し、最終的に本発明による DNA を単離することができる。LTC₄ 受容体活性は、cDNA を

動物細胞に形質転換してタンパク質に翻訳させ、これを LTC₄受容体に対する抗体やLTC₄の結合を指標としてスクリーニングすることによって確認することができる。タンパク質の翻訳には、動物細胞のみならず、インビトロトランスレーショングを利用することもできる。

本発明はこのようにして単離することができるタンパク質、並びにそれをコードする DNA を含む。すなわち本発明は、配列番号：17に示す DNA と、それによってコードされるアミノ酸配列（配列番号：18）からなるブタ由来の LTC₄受容体を提供する。更に本発明は、配列番号：21に示す DNA と、それによってコードされるアミノ酸配列（配列番号：22）からなるラット由来の LTC₄受容体を提供する。

その他、一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象（polymorphism）を示すと考えられている（例えば、Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem., 97, 153-159 を参照）。この多型現象によって1または複数個のアミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。これら多型に基づいて塩基配列に変異を生じた DNA も、本発明の DNA に含まれる。

また、化学合成 DNA は、DNA 合成機（例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社)など）を用いて合成することができる。DNA の化学的な合成法は、たとえばホスフアイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al. (1984) Nature, 10, 105-111)等として公知である。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター(Stratagene 社製)などがある。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用であ

る。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でタンパク質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター（プロメガ社製）、大腸菌であれば pET ベクター（Invitrogen 社製）などのベクターが知られている。脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol., 1, 854-864)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4(Invitrogen 社) 等を示すことができる。また培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であれば pME18S ベクター (Mol Cell Biol. 8:466~472(1988)) を用いることもできる。

ベクターへの本発明の DNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。

また、本発明は、本発明のベクターを保持する形質転換体に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。タンパク質を高発現させるための真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、あるいは酵母等の細胞を利用することができる。具体的には、サルの細胞である COS 細胞(Gluzman, Y. (1981) Cell, 23, 175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞(Invitrogen 社)等が公知である。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) *Med. Immunol.*, 20, 27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322)、pCDM8(Seed, B. (1987) *Nature*, 329, 840-842) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) *Virology*, 52, 456-457)、FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いた方法、および電気パスル穿孔法(Neumann, E. et al.(1982) *EMBO J.*, 1, 841-845)等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo(Sambrook, J. et al. (1989): " Molecular Cloning-A Laboratory Manual " Cold Spring Harbor Laboratory, NY)や pSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより LTC₄受容体を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。あるいは宿主細胞として 293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4(Invitrogen 社)などの発現ベクターを用いて目的とする形質転換細胞を得ることができる。

本発明における望ましい形質転換細胞は、細胞膜に LTC₄受容体を生物学的に活性な状態で発現する。したがってこの形質転換細胞に LTC₄を作用させると、形質転換細胞には LTC₄の刺激に対する応答が観察される。このような形質転換細胞は、後に述べる LTC₄受容体の結合活性を修飾する化合物のスクリーニングにも用いる

ことができる。

本発明による形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に本発明の LTC₄受容体が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

培養によって形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される本発明の LTC₄受容体は、各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。分離・精製方法としては、例えば LTC₄受容体タンパク質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば本発明の LTC₄受容体を表面に発現する細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより必要な膜分画を得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤(CHAPS、Triton X-100、ジキトニン等)で LTC₄受容体を可溶化することにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

本発明の LTC₄受容体はマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該 LTC₄受容体の発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitope などがある。また、マーカー配列と LTC₄受容体の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配

列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。例えば、ムスカリニアセチルコリン受容体と Hexa-Histidine tag とをトロンビン認識配列で連結した報告がある(Hayashi, M.K. and Haga, T. (1996) J. Biochem., 120, 1232-1238)

また、本発明は、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAに関する。本発明のDNAと「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは厳格な条件下で、本発明のDNAとハイブリダイズし、他のDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。このようなDNAは、本発明のDNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のDNAを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp～100bp、好ましくは15bp～40bpの鎖長を有する。プライマーとして好ましい塩基配列を、配列番号：7（フォワードプライマー）および配列番号：8（リバースプライマー）に示した。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列（またはその相補配列）を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。

本発明に基づくプローブやプライマーは、機能障害と関連したLTC₄受容体遺伝子の変異型の検出に利用することができる。欠失および挿入変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出できる。点突然変異は増幅DNAを標識LTC₄受容体ヌクレオチドとハイブリダイズさせることで同定できる。完全にマッチした配列とミスマッチの二重鎖とはRNアーゼ消化により、または融解温度の差異により区別できることが知られている。またDNA配列の差異は、配列を比較すべき領域の塩基配列を決定することによって検出することができる。あるいは、ゲルに含まれる変性剤の有無によるDNA断片の電気泳動の移動度の変化により検出する方法も公知である（Myers, R. M. et al. (1985) Science. 230, 1242-1246）。

特定位置での配列変化はヌクレアーゼプロテクションアッセイ（例えば、RNアーゼおよびS1プロテクション）または化学的開裂法によっても確認できる（Cotton et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397-4401）。

本発明に基づいて、LTC₄受容体の塩基配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。アレイ技法は公知で、遺伝子発現、遺伝的連鎖および遺伝的変異性を解析するために用いられている（Chee, M. et al. (1996) Science, 274, 610-613）。

さらに、被験者から得られたサンプルからの LTC₄受容体のレベルの異常な低下または増加を測定することにより、LTC₄受容体の過少発現、過剰発現または変化した発現により生ずる疾患またはその罹病性の診断に利用される。発現の低下または増加は、当業者で公知のポリヌクレオチド定量法のいずれか、例えばPCR、RT-PCR、RNアーゼプロテクション、ノーザンプロット、その他のハイブリダイゼーション法により RNA レベルで測定することができる。

これらの DNA に基づく診断のための試料は、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料から得ることができる。

また、「配列番号：1に記載のDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA」には、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのアンチセンスDNAが含まれる。アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。このようなアンチセンスDNAには、本発明のタンパク質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンスDNAは、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：1に記載のDNA）の配列情報を基にホスホロチオエート法（Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)）などにより調製することが可能である。

本発明によるアンチセンス DNA を用いて LTC₄受容体遺伝子をノックアウトすることにより、LTC₄受容体が関与する疾患の解明を進めることができる。

本発明の DNA またはアンチセンス DNA は、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo 法や in vivo 法などにより患者へ投与を行う。

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の LTC₄受容体に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、は各種動物に該 LTC₄受容体やその断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明の LTC₄受容体をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz, E. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523; Donnelly, J. J. et al. (1996) J. Infect. Dis., 173, 314-320) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は、LTC₄受容体タンパク質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下または静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造された血清または卵から、常法のタンパク質単離精製法によりポリクローナル抗体を分離精製することができる。ポリクローナル抗体の分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスティンの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Nature, 256, 495-497) により当業者が容易に製造するこ

とが可能である。本発明の LTC_4 受容体またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチングアニー・ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8.U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリーコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、RPMI-1640 などの通常よく用いられているものに適宜 10~30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマの培養上清を ELISA 法や免疫組織染色法などの周知の方法によってスクリーニングし、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で 2~4 日間、あるいはブリストンで前処理した BALB/c 系マウスの腹腔内で 10~20 日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。あるいは、ハイブリドーマを前記のような培地中で培養することもできる。

腹水や培養上清中に産生されるモノクローナル抗体は、常法のタンパク質単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアバタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。また、モノクローナル抗体またはその一部分を含む抗体断片は、該抗体をコードする遺伝子の全部または一部を発現ベクターに組み込み、大腸菌、酵母、または動物細胞に導入して生産させることもできる。

更には、本発明の LTC_4 受容体に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方

法 (Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352, 624-628; Zebedee, S. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3175-3179) により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al. (1994) *Nature*, 368, 856-859) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる (Methods in Enzymology 203, 99-121(1991))。

本発明によるポリクローナル抗体やモノクローナル抗体からは、常法により、ペプシン、パパイン等のタンパク質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法のタンパク質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'、あるいは Fv を得ることができる。

本発明のタンパク質に結合する抗体は、本発明のタンパク質の精製に加え、例えば、本発明のタンパク質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などからタンパク質を抽出し、ウエスタンプロット法、競合結合アッセイ、免疫沈降、ELISA 等の方法による本発明のタンパク質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

また、本発明のタンパク質に結合する抗体を、本発明のタンパク質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。

本発明は、本発明のタンパク質を利用した、被験化合物の LTC₄ 受容体活性を検出する方法、並びにこの検出方法に基づいて LTC₄ 受容体活性を修飾する化合物をスクリーニングする方法に関する。本発明の検出方法は、本発明のタンパク質と被験化合物とを接触させ、本発明のタンパク質の LTC₄ 受容体活性の変化を測定する工程を含む。更にこの検出方法を利用して、LTC₄ 受容体活性を修飾する物質を選択することにより本発明のスクリーニング方法を実施することができる。「LTC₄

受容体活性を修飾する」とは、単独で本発明の LTC₄受容体に結合し、シグナルを伝達すること、または LTC₄と競合し、LTC₄によるシグナル伝達を阻害することを言う。

本発明の検出方法において、LTC₄受容体活性の変化は、スクリーニングに用いる LTC₄受容体タンパク質の生理学的な特性に応じた活性の指標を測定することにより行われる。指標とする活性とは、たとえばリガンドとの結合活性であり、あるいはリガンドの結合によってもたらされる刺激に対する応答である。具体的には、以下に述べるような検出方法を示すことができる。また本発明によるスクリーニング方法のための被験化合物としては、例えば次のような化合物を用いることができるが、これらの化合物に限定されること無く、あらゆる化合物を被験化合物とすることができます。

ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物

ペプチド

LTC₄受容体に対する抗体

コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N.K., et al. (1995)

Tetrahedron, 51, 8135-8137) によって得られた化合物群

ファージ・ディスプレイ法 (Felici, F., et al. (1991) J. Mol. Biol., 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群

微生物の培養上清

植物や海洋生物由来の天然成分

動物組織抽出物

あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチド

続いて、代表的なスクリーニング方法について具体的に説明する。

a) リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明の LTC₄受容体に結合する化合物は、リガンド結合アッセイ法によりスクリ

リーニングすることができる。まず LTC_4 受容体タンパク質を発現させた細胞膜、あるいは LTC_4 受容体タンパク質精製標品を調製する。緩衝液、イオン、pH のようなアッセイ条件を最適化したバッファー中で、 LTC_4 受容体タンパク質を発現させた細胞膜、あるいは LTC_4 受容体タンパク質精製標品を、標識リガンドとともに被験化合物と共に一定時間インキュベーションする。標識リガンドには、例えば [3H] LTC_4 を用いることができる。反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被験化合物存在下における標識リガンドの特異的結合の阻害を指標に、 LTC_4 受容体に拮抗する化合物をスクリーニングすることができる。

たとえば、実施例 4 記載のリガンド結合アッセイ条件下で、 [3H] LTC_4 とともに被験化合物を一定時間インキュベーションしたときの IC50 が 10 μM 以下の物質を、更に好ましくは IC50 が 1 μM 以下の物質を選択することができる。

b) GTP γ S 結合法を利用したスクリーニング方法

本発明の LTC_4 受容体の活性を修飾する化合物は、GTP γ S 結合法によりスクリーニングすることが可能である (Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993) Br. J. Pharmacol. 109, 1120-1127)。 LTC_4 受容体を発現させた細胞膜を 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM GDP 溶液中で、 ^{35}S で標識された GTP γ S 400 pM と混合する。被験化合物存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合した GTP γ S の放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被験化合物存在下における特異的な GTP γ S 結合の上昇を指標に、該 LTC_4 受容体のアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。また、被験薬存在下における、 LTC_4 または LTD_4 による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に LTC_4 受容体のアンタゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。

c) 細胞内 Ca⁺⁺ および cAMP 濃度の変動を利用したスクリーニング方法

本発明の LTC_4 受容体の活性を修飾する化合物は、 LTC_4 受容体を発現させた細胞

の細胞内 Ca^{++} または cAMP 濃度の変動を利用してスクリーニングすることが可能である。 Ca^{++} 濃度の測定は fura2、fluo3 等を用い、また cAMP 濃度の測定は市販の cAMP 測定キット (Amersham 社等) を用いて測定できる。その他 Ca^{++} および cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより、間接的に Ca^{++} および cAMP 濃度を測定することもできる。LTC₄ 受容体を発現させた細胞と受容体を発現させていない宿主細胞 (コントロール細胞) に被験化合物を一定時間作用させ、 Ca^{++} および cAMP 濃度を直接あるいは間接的に測定する。コントロール細胞と比較して、LTC₄ 受容体を発現させた細胞特異的な Ca^{++} の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下を指標にアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。また、被験化合物存在下における、LTC₄ または LTD₄ による Ca^{++} の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下の阻害作用を指標に該 LTC₄ 受容体のアンタゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング方法において選択すべきアンタゴニスト活性を有する化合物とは、本発明の LTC₄ 受容体に対してリガンドである LTC₄ または LTD₄ と競合し、かつ LTC₄ 受容体に結合したときにシグナルの伝達を伴わない化合物と定義することができる。アンタゴニストの本発明による LTC₄ 受容体に対する親和性は制限されないが、IC₅₀ が 10 μM 以下、特に 1 μM 以下の化合物が望ましい。本明細書においては、アンタゴニストは、遮断剤、あるいは拮抗剤と同義の用語として用いられる。

たとえば、実施例 5 記載の条件で、被験化合物を一定時間作用させ LTC₄ または LTD₄ による細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇の阻害を指標にその IC₅₀ が 10 μM 以下の物質を、更に好ましくは IC₅₀ が 1 μM 以下の物質をアンタゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

これらのスクリーニングにより単離される LTC₄ 受容体タンパク質の活性を修飾する化合物を主成分として、LTC₄ 受容体を標的とする医薬を得ることができる。

例えば実施例において選択された化合物A (N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-6-(1-propyl-1H-benzimidazol-2-yl)-1-naphthalenesulfonamide) は、IC50=1.2 μ Mを有する、本発明の LTC₄受容体タンパク質に対するアンタゴニストである。化合物Aは、LTC₄受容体と LTC₄の結合を用量依存的に阻害する。更に化合物Aは、本発明の LTC₄受容体タンパク質の細胞遊走活性や、冠動脈平滑筋細胞の LTC₄に対する応答を用量依存的に阻害する。これらの事実から、本発明のスクリーニング方法によって、本発明の LTC₄受容体タンパク質のアンタゴニストを選択できることが明らかである。本発明の LTC₄受容体タンパク質のアンタゴニストは、LTC₄受容体を標的とする医薬として有用である。

本発明の LTC₄受容体タンパク質の活性を修飾する化合物を有効成分とする医薬製剤は、有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望ましい。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロビルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミニン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従つて、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

- 25 -

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80 等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。本発明による医薬の投与量は、前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

例えば経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重 60 kg として）において、1 日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは 0.1 ~ 50 mg である。また非経口投与の場合、注射剤の形では 1 日につき 0.01 ~ 50 mg、好ましくは 0.01 ~ 10 mg である。

図面の簡単な説明

図 1 は、LTC₄ 受容体に対する [³H]- LTC₄ の特異的結合の飽和曲線を示すグラフである。図中、縦軸はタンパク質 1 mg 当たりの [³H]- LTC₄ 結合量 (fmol) を、横軸は反応液中の [³H]- LTC₄ 濃度 nM を示す。

図 2 は、LTC₄ 受容体に対する [³H]- LTC₄ の特異的結合の Scatchard 分析の結果を示す。図中、縦軸は結合率（結合／フリー比）を、横軸はタンパク質 1 mg 当たりの [³H]- LTC₄ 結合量 (fmol) を示す。

図 3 は、細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の上昇に対する LTC₄ の用量依存性の結果を示す。図中、縦軸は蛍光強度の最高値 (counts) を、横軸は反応液中の LTC₄ 濃度 (logM) を示す。

図 4 は、組織におけるヒト LTC₄ 受容体の遺伝子発現分布をノーザンプロットハ

イブリダイゼーション法によって解析した結果を示す写真である。

図5は、心血管系におけるヒト LTC₄受容体の遺伝子発現分布をPCR法によって解析した結果を示す写真である。

図6は、LTC₄受容体発現 CHO 細胞の細胞遊走に対する LTC₄の用量依存性の結果を示す。図中、縦軸は吸光度(595nm)を、横軸は反応液中の LTC₄濃度(-logM)を示す。

図7は、LTC₄による細胞遊走に対する化合物Aの用量依存的阻害の結果を示す。図中、縦軸は化合物なしのコントロールにおける吸光度を100%としたときの吸光度(%)を、横軸は反応液中の化合物Aの濃度(μM)を示す。

図8は、LTC₄による冠動脈平滑筋細胞の細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇に対する化合物Aの用量依存的阻害の結果を示す。図中、縦軸は蛍光強度を、横軸は時間を示す。また、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化のタイムコースの内容については矢印で示す。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例1. オリゴキヤップ法によるcDNAライブラリーの作製

ヒト胎盤組織(PLACE1)より、文献(J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1989)記載の方法によりmRNAを抽出した。さらに、オリゴdTセルロースでpoly(A)+RNAを精製した。

poly(A)+RNAよりオリゴキヤップ法[M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]によりcDNAライブラリーを作成した。Oligo-cap linker(配列番号:3)およびオリゴdTプライマー(配列番号:4)を用いて文献[鈴木・菅野, タンパク質 核酸 酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)]の記載にしたがってBAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)処

理、TAP (Tobacco Acid Phosphatase) 処理、RNA ライゲーション、第一鎖 cDNA の合成と RNA の除去を行った。次いで、5' (配列番号: 5) と 3' (配列番号: 6) の PCR プライマーを用い PCR (polymerase chain reaction) により 2 本鎖 cDNA に変換し、SfiI 切断した。次いで、DraIII で切断したベクター pME18SFL3 (GenBank AB009864, Expression vector) に cDNA の方向性を決めてクローニングし、cDNA ライブライマーを作成した。これらより得たクローニングのプラスミド DNA について、挿入 cDNA サイズが 1 kb 以下のクローニングを除いた後、cDNA の 5' 端と 3' 端の塩基配列を DNA シーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit または BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems 社製) を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNA シーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems 社製) で DNA 塩基配列を解析した。

実施例 2. シグナル配列をもつクローニングの選択

5' - 末端配列の中のすべての ATG コドンから予測される推定アミノ酸配列について、中井・金久が開発したタンパク質の局在性予測プログラム「PSORT」を用い、多くの分泌タンパク質のアミノ末端に特徴的なシグナルペプチドと予測される配列の有無を解析することにより、シグナル配列をもつと予測されるクローニングを特異的に選別した。この選別により、分泌タンパク質、または膜タンパク質をコードしている可能性の高いクローニングを選ぶことができる。5' - 端配列データ (one pass sequencing) から ATGpr1 [A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells, Bioinformatics, 14: 384-390 (1998); <http://www.hri.co.jp/atgpr/>] の最大値が 0.7 以上で、シグナル配列 (PSORT で解析) を持ち、かつ、5' - 端配列データでの ORF が存在するものを選別した。

実施例 3. PSEC0146 の配列決定

実施例 2 で選択したクローンについて、全長 cDNA の塩基配列、並びに推定アミノ酸配列を決定した。塩基配列は、次に示す 3 種の方法を組み合わせ、各方法によって決定した塩基配列を完全にオーバーラップさせ、最終的な確定塩基配列を決定した。決定された cDNA 配列から、推定アミノ酸配列を明らかにした。

(1) Licor DNA シーケンサーを用いた cDNA 挿入断片両末端からのロングリードシーケンス (Licor シーケンサー (アロカ社販売) のマニュアルに従ってシーケンシング反応後、Licor シーケンサーで DNA 塩基配列を解析した)、

(2) AT2 トランスポゾン試験管内転移を用いた Primer Island 法によるネストドシーケンス [S. E. Devine and J. D. Boeke, Nucleic Acids Res., 22: 3765-3772, (1994)] (PE Biosystems 社製のキットとマニュアルにしたがってクローンを取得後、PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

(3) カスタム合成 DNA プライマーを用いたダイテオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング(カスタム合成 DNA プライマーをもちい PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

これらの配列について、ATGpr と PSORT による解析および GenBank や SwissProt に対する BLAST 解析を行った。ほとんどのクローンが N-末端にシグナル配列をもつ分泌タンパク質、または膜タンパク質であると推定された。このように決定された全長 cDNA の一つを、PSEC0146 と名づけた。PSEC0146 の塩基配列を配列番号：1 に、この塩基配列によってコードされる推定アミノ酸配列を配列番号：2 に記載した。

実施例 4. COS 細胞による LTC₄ 受容体の発現と LTC₄ との結合実験

以下の実験によって PSEC0146 がコードするタンパク質の LTC₄ 受容体活性を確認した。まずこの cDNA がコードするタンパク質を発現させるために、当該 cDNA

をヒト脾臓由来の poly(A)+ RNA (Clontech 社) を鋳型として RT-PCR により取得した。RT-PCR に必要なプライマーの塩基配列は、実施例 3 で決定した塩基配列情報のもとに設定した。

RT-PCR には、配列番号：7 で示されるオリゴヌクレオチドをフォーワードプライマーとして、配列番号：8 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いた（それぞれの 5' 末端には XbaI site が付加してある）。RT-PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社) を用い 5% DMSO 存在下で 98 °C (10 秒) / 58 °C (30 秒) / 72 °C (2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pEF-BOS plasmid (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジテオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。得られたプラスミドは、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の全長をコードする配列を含むことが確認された。このプラスミドを pEF-BOS-PSEC0146 とした。

175mm² 培養フラスコに COS-1 細胞を 2x10⁶ 細胞で播種して 36 時間培養後、50 μg の pEF-BOS-PSEC0146 または pEF-BOS (空ベクター) を FuGENE6 (Boeringer Mannheim 社) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、36 時間培養した細胞を回収、洗浄後、20 mM Tris.HCl (pH7.4) , 5 mM EDTA, に懸濁してポリトロンにてホモジエナイスした。超遠心後、50 mM HEPES (pH7.4) , 40 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, に懸濁し、これを膜画分とした。

膜画分 5 μg に [³H]- LTC₄ (第一化学薬品) を最終濃度 0.5~14x10⁻⁹ M になるように加え、50 mM HEPES (pH7.4) , 40 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM L-Serine, 10 mM Borate, 2 mM L-Cystein, 2 mM L-Glycine, からなる溶液 250 μl 中で室温 1 時間インキュベーションし、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。グラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで膜画分への総結合量を測定した。さらに、前述の試験に最終濃度 2 μM

の LTC_4 (CAYMAN 社) を加えることで、膜画分への非特異的結合量を測定した。その結果、 $[^3\text{H}]\text{-LTC}_4$ は pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分に特異的に結合することが分かった。pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分への $[^3\text{H}]\text{-LTC}_4$ の特異的結合の飽和曲線を図 1 に示した。また、この結合の Scatchard 分析の結果を図 2 に示した。Scatchard 分析の結果から、pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分に対する LTC_4 の結合の解離定数は $K_d=2.20 \text{ nM}$ で、最大結合は $B_{\text{max}}=10.4 \text{ pmol/mg protein}$ であった。一方、空ベクターを遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分では特異的結合は観察されなかった。

以上のように、本発明の LTC_4 受容体は、これまでその存在が示唆されながら実体が不明であった LTC_4 に強い親和性を持つ受容体であることが確認された。本 LTC_4 受容体で形質転換した細胞を用いることで初めて結合実験および拮抗薬のスクリーニングが可能となつた。

実施例 5. HEK293-EBNA 細胞による LTC_4 受容体の発現と LTC_4 による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化

96well Black/clear bottom plate, collagen type I coated (BECTON DICKINSON 社製)に HEK293-EBNA 細胞を 1 ウェルあたり 2.5×10^4 細胞で播種して 24 時間培養後、1 ウェルあたり 40 ng の pEF-BOS-PSEC0146 または pEF-BOS (空ベクター) を FuGENE6 (Boeringer Mannheim 社) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後、培地を廃棄し、 $4 \mu\text{M}$ Fluo-3, AM (Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid および 10%FBS を含む DMEM を 1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 添加し、37°Cで 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を 20mM HEPES を含む Hanks BSS (GIBCO 社製) で 4 回洗浄して、1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ の 20mM HEPES を含む Hanks BSS を添加した。細胞内 Ca^{++} 濃度の変化は FLIPR (Molecular Device 社製) を用いて経時的に測定した。すなわち、測定開始 10 秒後に LTC_4 を最終濃度 2×10^{-6}

M から 1×10^{-12} M になるように添加し、添加後、50秒間は1秒ごとに、さらに4分間は6秒ごとに蛍光強度を測定した。pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した細胞は LTC₄ の用量依存的な細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇が観察された。一方、空ベクターを遺伝子導入した細胞では LTC₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化は観察されなかった。結果を図3に示した。図3は、pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した細胞の細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化データの蛍光強度の最高値を縦軸に、LTC₄ の濃度を横軸にプロットしたものである。pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した細胞の LTC₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄ の EC50 = 3.46 nM であることがわかった。また同様に LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した結果、LTD₄ の EC50 = 3.68 nM であることがわかった。以上のように、本 LTC₄ 受容体で形質転換した細胞は LTC₄ および LTD₄ に反応して用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化を誘導することが確認された。細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化を測定することで、被験化合物の LTC₄ 受容体活性を修飾する活性を検出することができる。更に、この検出方法に基づいて LTC₄ 受容体活性を低下させる化合物を選択することによって、アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングが可能となった。

実施例 6. LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の構築

ヒト LTC₄ 受容体を発現させるための発現ベクターとして pEF-BOS-dhfr-PSEC0146 を用いた。10cm シャーレに CHO-dhfr(-) 株を 1×10^6 細胞で α MEM (核酸存在) 培地を用いて播種し 1 日培養後、8 μ g の pEF-BOS-dhfr-PSEC0146 を FuGENE6 (Boeringer Mannheim 社製) を用いて遺伝子導入した。24 時間後、遺伝子導入した細胞を回収し、 α MEM (核酸非存在) 培地／100 nM Methotrexate (和光純薬社製) に懸濁後、段階希釈して 10cm シャーレに播き直した。2 週間後に出現したコロニーを個別に取得し、LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞とした。

LTC₄ との結合実験のために LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞を培養後、細胞を回収、

洗浄し、20 mM Tris.HCl (pH7.4) , 5 mM EDTA に懸濁してポリトロンにてホモジエナイスした。超遠心後、50 mM HEPES (pH7.4) , 40 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, に懸濁し、これを膜画分とした。実施例4と同条件にて膜画分 15 μ g に対して [³H]-LTC₄ の結合実験を行った。実施例5と同様に、LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分への [³H]-LTC₄ の特異的結合の飽和曲線を書いた。また、この結合の Scatchard 分析の結果から、LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分に対する LTC₄ の結合の解離定数は $K_d = 2.65$ nM で、最大結合は $B_{max} = 6$ pmol/mg protein であった。

また、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化の測定のために、96well Black/clear bottom plate (BECTON DICKINSON 社製)に LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞を 1 ウエルあたり 2 x 10⁴ 細胞で播種して 24 時間培養後、培地を廃棄し、4 μ M Fluo-3, AM (Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid、1%FBS、20mM HEPES、2.5mM probenecid を含む Hanks BSS を 1 ウエルあたり 100 μ l 添加し、37°Cで 1 時間インキュベーションした。LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化は実施例5と同条件にて FLIPR を用いて測定した。LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄ の EC₅₀ = 0.44 nM、LTD₄ の EC₅₀ = 0.59 nM であることがわかった。

以上のように、本 LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞においても、COS 細胞や HEK293-EBNA 細胞に一過的に発現させたときと同様に、LTC₄に強い親和性を持ち、LTC₄ に反応して用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。

実施例7. 細胞におけるヒト LTC₄受容体の遺伝子発現分布

ノーザン ブロット ハイブリダイゼーション法によりヒト LTC₄受容体遺伝子の発現分布を解析した。ヒト LTC₄受容体遺伝子のプローブには cDNA 断片 (配列番号: 1 の第 947 番目から第 1626 番目) を用いた。ヒトの各臓器由来の poly A+ RNA (2 μ g) をプロットしたメンブレン (Clontech 社製) とプローブのハイブリダ

イゼーションは 50% ホルムアミド、5 x SSPE、10 x Denhardt's 溶液、2% SDS、100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA を含む溶液中で、42°C (22 時間) で行った。メンブレンは、最終的に 0.2 x SSC、0.1% SDS を含む溶液で 2 回 (65°C、20 分) 洗浄した。

ヒトの各臓器（心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球、胃、甲状腺、脊髄、リンパ節、気管、副腎、骨髄）についてノーザン解析を行ったところ、図 4 に示すように約 5kb の mRNA が心臓、胎盤、脾臓、末梢血白血球、副腎で強く検出された。脳、腎臓、前立腺、卵巣、脊髄、リンパ節でも若干シグナルが検出された。以上のことから、本 LTC₄ 受容体はペプチドロイコトリエンに起因する心臓血管障害、炎症やアレルギー症状への関与が予想された。

実施例 8. 心臓血管系におけるヒト LTC₄ 受容体の遺伝子発現分布

PCR 法によりヒト LTC₄ 受容体遺伝子の心臓血管系における発現分布を解析した。

PCR にはヒトの心臓各部位（左心房、右心房、左心室、右心室、動脈、静脈、心室中隔、心膜）由来の一本鎖 cDNA (BioChain 社製) を錆型として、配列番号：9 で示されるオリゴヌクレオチドをフォーワードプライマーとして、また、配列番号：10 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーを用いた。PCR は T_{aq} DNA polymerase (宝酒造社製) を用い 5% DMSO 存在下で 94 °C (30 秒) / 50 °C (30 秒) / 72 °C (1 分) のサイクルを 30 回繰り返した。また、内部標準としては上記のヒトの各部位の cDNA を錆型として、Human G3PDH Control Amplimer Set (Clontech 社製) を用いて、同条件の PCR を行った。反応産物は 1% アガロースゲルにて電気泳動して解析した。また、正常ヒト冠動脈内皮細胞、正常ヒト冠動脈平滑筋細胞、正常ヒト肺微小血管内皮細胞、正常ヒト成人皮膚微小血管内皮細胞、正常ヒト新生児皮膚微小血管内皮細胞、正常ヒト大動脈内皮細胞、正常ヒト肺動脈

内皮細胞、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Clonetics社製) から ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて total RNA を精製した。各細胞由来の total RNA 5 μ g を DNase (Nippon Gene社製) を用い 37 °C で 15 分反応させた。DNase 处理した total RNA をスーパースクリプトファーストストランドシステム (RT-PCR 用) (GIBCO社製) にて cDNA 変換した。この cDNA を 鑄型として上記と同条件にて PCR を行った。その結果を図 5 に示した。LTC₄受容体の約 450bp の增幅産物は左心房、右心房、左心室、右心室および冠動脈平滑筋細胞で強く検出された。また、心室中隔、心膜、肺微小血管内皮細胞、成人皮膚微小血管内皮細胞、新生児皮膚微小血管内皮細胞、肺動脈内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞にも弱いシグナルが検出された。以上の結果からベチドロイコトリエンの機能として知られている心収縮力や冠血流量の低下作用に本 LTC₄受容体が関与していることが予想された。

実施例 9. 血球細胞におけるヒト LTC₄受容体の遺伝子発現分布

健常人ボランティアよりヘパリン採血し、6% デキストラン／生理食塩水を 1/3 量加えて室温にて 1 時間放置した。上清を取り、150 x g で 5 分遠心処理後、沈査を Hunk's Balanced Solt Solution (HBSS) に懸濁した。これを等量の Ficoll-Paque (Pharmacia 社) に重層し、400 x g で 30 分遠心処理を行った。中間層を単核球画分、沈査を多核白血球として分取した。多核白血球は、CD16 マイクロビーズ (第一化学薬品社製) を加え、磁器スタンドにて好中球画分と好酸球画分に分離した。単核球画分、好中球画分、好酸球画分のそれぞれは生理食塩水にて洗浄後、ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて total RNA を精製した。各分画由来の total RNA 5 μ g を DNase (Nippon Gene 社製) を用い 37 °C で 15 分反応させた。DNase 处理した total RNA をスーパースクリプト ファーストストランドシステム (RT-PCR 用) (GIBCO 社製) にて cDNA 変換した。

LTC₄受容体の発現分布は上記血球画分の cDNA を鋳型として、実施例 8 と同一の条件で PCR 解析を行った。LTC₄受容体の約 450bp の增幅産物は健常人 A、B とともに各血球画分で検出された。とりわけ好酸球でよく検出された。以上の結果から好酸球を起因とする疾患、例えば、喘息などのアレルギー疾患に本 LTC₄受容体が関与していることが予想された。

実施例 10. ヒト LTC₄受容体遺伝子の染色体の位置の決定

ヒト LTC₄受容体遺伝子の染色体の位置を決定するために、ヒト／ハムスター ラジエーションハイブリッドパネル GeneBridge 4 panel (Sanger Center) および G3 panel (Stanford University) (Research Genetics 社製) を鋳型に、配列番号：1 1 で示されるオリゴヌクレオチドをフォーワードプライマーとして、また、配列番号：1 2 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして PCR を行った。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社) を用い 5% DMSO 存在下で 98 °C (10 秒) / 58 °C (30 秒) / 72 °C (2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。パネル内の各ベクターに対して LTC₄受容体に特異的な約 600 bp の DNA 断片の増幅の有無をポジティブ、ネガティブとして、その結果をインターネットを介して <http://www.genome.wi.mit.edu>、および <http://www-shgc.stanford.edu/RH/index.html> にて解析した。その結果、本 LTC₄受容体遺伝子はクロモゾーム 13q14 の染色体マーカーの D13S153(GeneBridge 4) と SHGC-12474 (G3) に最も近かった。この染色体位置はアトピー性の喘息とのリンクエージ (Kimura, K., et al. (1999) Human Molecular Genetics 8, 1487-1490) が示されている。また、この染色体位置は B 細胞白血病患者で遺伝子の欠失が確認されている (Kalachikov, S., et al. (1997) Genomics 42, 369-377)。本 LTC₄受容体遺伝子の変異が上記の疾患と関していることが予想された。

実施例 1-1. LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞を用いた LTC₄受容体と LTC₄の結合を阻害する化合物のスクリーニング

実施例 6 で作製した LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分を用いて LTC₄の結合を阻害する活性を指標に候補化合物のスクリーニングを行った。実際には、LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分 15 μg を含む 50 mM HEPES (pH7.4), 40 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM L-Serine, 10 mM Borate, 2 mM L-Cysteine, 2 mM L-Glycine, からなる溶液に一定濃度の候補化合物と 0.5x10⁻⁹ M の [³H]-LTC₄ を添加し、室温で 1 時間インキュベーションした後、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。グラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。また、同時に前述の試験において候補化合物を添加しないもの、最終濃度 1 μM の LTC₄ を加えたものをそれぞれ総結合量、非特異的結合量として放射活性を測定した。このような条件で、IC50 が 10 μM 以下の化合物として、例えば、N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-6-(1-propyl-1H-benzimidazol-2-yl)-1-naphthalenesulfonamide (化合物 A) が挙げられる。この化合物は LTC₄受容体と LTC₄の結合を用量依存的に阻害し、その IC50 は 1.2 μM であった。なお化合物 A は以下の方法で製造した。

製造例 1

¹H NMR は内部標準としてテトラメチルシラン (δ ; 0.00 ppm) を用いた。

製造例 1-1 2-(2-ナフチル)ベンズイミダゾール

塩化メチレン (40ml) にフェニレンジアミン 2.335g を加え、さらに 2-塩化ナフトイル 4.105g を加えて室温にて一晩攪拌した。溶媒を留去し、無色固体 6.391g を得た。

この固体に 1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン 40ml を加えて 170°C で一晩攪拌した。減圧下溶媒を留去し、残差をエーテルに溶解した後、飽和重曹水、飽和食塩水にて洗浄した。エーテル層を硫酸マグネシウムで脱水後、溶媒を留去すると

- 37 -

褐色固体が約 6.5g 得られた。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム）にて分離・精製すると、2-(2-ナフチル)ベンズイミダゾールが 3.514g(67%)得られた。

GC MS; 244(M⁺)

製造例 1-2 2-(2-ナフチル)-1-プロピルベンズイミダゾール

製造例 1-1 にて得られた 2-(2-ナフチル)ベンズイミダゾール 1.486g を N,N-ジメチルホルムアミド 20ml に溶解し、60%水素化ナトリウム 300mg を加えた。15 分攪拌後、ヨウ化プロピル 0.72ml を加え、1 時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去した後、1 規定水酸化ナトリウム水溶液を加え、エーテルにて抽出した。エーテル層を硫酸マグネシウムで脱水後、溶媒を留去すると赤みを帯びた残差が得られた。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム-ヘキサン；1:1～クロロホルムのみ）にて分離・精製すると無色固体の 2-(2-ナフチル)-1-プロピルベンズイミダゾールが 1.195g(77%)得られた。

¹H NMR(90MHz, CDCl₃)； 0.85(t, 3H), 1.74-1.99(m, 2H), 4.18-4.35(m, 2H), 7.25-8.21(m, 11H)

GC MS; 286(M⁺)

製造例 1-3 N-(3,4-ジメチル-5-イソキサゾリル)-6-(1-プロピルイミダゾール-2-イル)ナフタレンスルホンアミド

製造例 1-2 で得られた 2-(2-ナフチル)-1-プロピルベンズイミダゾール 1.601g をクロロホルム 4ml に溶解し、室温にてクロロ硫酸(1.2ml)クロロホルム溶液(2ml)を滴下した。滴下後、2 時間加熱還流し、放冷すると反応液が上層（クロロホルム層）と下層（生成物）に分離した。上層を分離し、下層をクロロホルムで洗浄すると、褐色油状物が得られた。

この化合物にプロピルアミン 3.2ml、クロロホルム 2ml を加え、5 分間加熱還

流した。放冷後、オキシ塩化リン 10ml を加え、さらに 30 分間加熱還流した。放冷後、反応液を氷水に注ぎ、クロロホルムにて抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水にて洗浄した後、硫酸マグネシウムにて脱水した。減圧下、溶媒を留去し、粗生成物を 2.703g 得た。

この化合物の塩化メチレン(5ml)溶液を、5-アミノ-3,4-ジメチルイソキサゾール 457mg をピリジン 2ml に溶解したものに加えた。一日攪拌後、クロロホルムを加え、0.1 規定塩酸、飽和食塩水にて洗浄した後、硫酸マグネシウムで脱水した。減圧下、溶媒を留去すると褐色泡状物が得られた。このものを中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール; 100:1~10:1)にて分離し、得られた粗生成物をアセトン-ヘキサン-エーテルにて再結晶すると N-(3,4-ジメチル-5-イソキサゾリル)-6-(1-プロピルイミダゾール-2-イル)ナフタレンスルホンアミド 221mg(12%)が得られた。

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆); 0.72(t, 3H), 1.72(q, 2H), 4.42(t, 2H), 7.29-7.38(m, 2H), 7.74-7.79(m, 3H), 8.14(q, 1H), 8.24(q, 1H), 8.48(d, 1H), 8.60(d, 1H), 8.76(d, 1H)

FAB MS; 461(M⁺+1)

実施例 12. LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞を用いた LTC₄による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を阻害する化合物のスクリーニング

実施例 6 で作製した LTC₄受容体安定発現 CHO 細胞を 96well Black/clear bottom plate に 1 ウェルあたり 2 x 10⁴ 細胞で播種して 24 時間培養後、培地を廃棄し、4 μM Fluo-3, AM(Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid、1%FBS、20mM HEPES、2.5mM probenecid を含む Hanks BSS を 1 ウェルあたり 100 μl 添加し、37°Cで 1 時間インキュベーションした。一定濃度の候補化合物の添加 5 分後に、1nM LTC₄を添加し、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化は実施例 6 と同条件にて FLIPR を

用いて測定した。例えば、実施例 1 1 で選択した化合物 A は LTC_4 受容体安定発現 CHO 細胞の LTC_4 による細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇を用量依存的に抑制することから、 LTC_4 受容体のアンタゴニストであることが分かった。その IC50 は $2.3 \mu M$ であった。またこの化合物 A は、 LTC_4 受容体安定発現 CHO 細胞の LTD_4 による細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇も用量依存的に抑制した。

実施例 1 3. LTC_4 受容体発現 CHO 細胞の LTC_4 による細胞遊走と LTC_4 受容体アンタゴニストによる阻害

8 μm ポア ポリカーボネット フレームフィルター (Neuroprobe 社製) を $10 \mu g/ml$ フィブロネクチン (旭テクノグラス社) / PBS にて $4^{\circ}C$ で一晩処理した。96 blind ウエルチャンバー (Neuroprobe 社製) の下層に $0 \sim 1 \mu M$ の LTC_4 を入れ、フィブロネクチン処理したフレームフィルターをセットし、 LTC_4 受容体発現 CHO 細胞と空ベクター導入 CHO 細胞を α MEM (核酸非存在) 培地 / 0.1% BSA で懸濁後、 2×10^5 細胞でチャンバー上層に播種した。 $37^{\circ}C$ CO_2 インキュベーターにて 4 時間培養後、フレームフィルターをメタノールにて固定し、Diff-Quik 染色キット (国際試薬株式会社) にて染色した。このフィルターの上層面 (細胞をのせた側) を拭き取り、風乾後、プレートリーダー (Molecular Devices 社) で 595 nm の吸光度を測定した。その結果を図 6 に示した。 LTC_4 受容体発現 CHO 細胞は LTC_4 に対して遊走活性が最大となり、さらに高濃度では遊走活性が抑制されるというペル型の走化性を示した。本 LTC_4 受容体は細胞遊走を誘導する活性を有していることが確認された。上記細胞遊走系において、上層に一定濃度の実施例 1 1 で選択した化合物 A を添加し、下層に 3 nM LTC_4 を添加して細胞遊走活性を測定した。その結果を図 7 に示した。この化合物は用量依存的に LTC_4 による細胞遊走を抑制することが分かった。ペプチドロイコトリエンは好酸球や好中球 (Spada, C. S.,

- 40 -

et al. J. Leukoc. Biol. (1994) 55, 183-191, Folco, F., et al. Novel Inhibitor of Leukotrienes (1999) 83-100, Birkhauser Verlag, Basel)、また、血管内皮細胞 (Kanayasu, T. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1989) 159, 572-578) の細胞遊走を誘導することが知られている。実施例8、9で示すように本 LTC₄受容体は好酸球、好中球および血管内皮細胞に発現していることから、これらの細胞の細胞遊走を介して、炎症やアレルギー症状、例えば、喘息などの増悪化に関与していることが示唆された。以上のことから、本 LTC₄受容体アンタゴニストは細胞遊走を抑制することによる抗炎症作用を有すると考えられる。

実施例14. 冠動脈平滑筋細胞の LTC₄による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇と LTC₄受容体アンタゴニストによる阻害

実施例8で本 LTC₄受容体の発現を確認したヒト冠動脈平滑筋細胞を 96well Black/clear bottom plate に 1 ウエルあたり 4×10^4 細胞で播種して 24 時間培養し、細胞を洗浄後、SMBM 培地 (Clonetics 社製) と置換し、さらに 48 時間培養した。培地を廃棄し、4 μ M Fluo-3, AM (Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid、1%FBS、20mM HEPES、2.5mM probenecid を含む Hanks BSS を 1 ウエルあたり 100 μ l 添加し、37°Cで 1 時間インキュベーションした。LTC₄による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化は実施例6と同条件にて FLIPR を用いて測定した。0, 10⁻⁶～10⁻⁹M について測定した結果、ヒト冠動脈平滑筋細胞は LTC₄の用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。上記測定系において、一定濃度の実施例1 1 で選択した化合物 A またはカルシウムチャンネルブロッカーである Nifedipine (フナコシ社製) で 5 分間前処理をし、LTC₄による冠動脈平滑筋細胞の細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化を測定した。その結果を図8に示した。この化合物は用量依存的に LTC₄による冠動脈平滑筋細胞の細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を抑制することが確認された。血管平滑筋細胞における細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇が血管収縮を引き

起こすことはよく知られている (Bolton, T. B., et al. *Physiol. Rev.* (1979) 59, 606-718)。Nifedipine は血管平滑筋の細胞内への Ca^{++} の流入を抑制することにより血管拡張薬として狭心症や高血圧治療薬として利用されている (Silver, P. J., *Calcium Bolckers. Mechanisms of Action and Clinical Applications.* (1982) 37, Urban & Schwarzenberg, Baltimore)。実際に、上記の測定系において Nifedipine は細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇を抑制した。以上のことから、本 LTC_4 受容体アンタゴニストは血管平滑筋細胞の細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇を抑制することによる血管拡張作用を有すると考えられる。

実施例 15. ブタ LTC_4 受容体遺伝子のクローニング

配列番号 1 で示した PSEC0146 遺伝子配列情報からデザインした配列番号: 1 3 で示されるオリゴヌクレオチドと配列番号: 1 4 で示されるオリゴヌクレオチドの組み合わせ、および、配列番号: 1 5 で示されるオリゴヌクレオチドと配列番号: 1 6 で示されるオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いて PCR 法によって cDNA を取得した。PCR はブタ骨格筋から ISOTISSUE (日本ジーン社製) にて取得したブタゲノム DNA を鋳型として Pyrobest DNA polymerase を用い 5% DMSO 存在下で 98 °C (10 秒) / 50 °C (30 秒) / 72 °C (2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、それぞれ約 1.0 kbp および 0.6 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR-blunt (Invitrogen 社製) にクローニングし、得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer を用いて解析した。解析結果をコンティグして明らかになった塩基配列を配列番号: 1 7 に示した。同配列は 1038 塩基のオープンリーディングフレームを持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (345 アミノ酸) を配列番号: 1 8 に示した。このアミノ酸配列はヒト LTC_4 受容体のアミノ酸配列と 77.7% の相同性を有していた。

実施例 16. ラット LTC₄受容体遺伝子のクローニング

配列番号 1 で示した PSEC0146 遺伝子配列を用いた Genbank に対する BLAST(Basic local alignment search tool) [S. F. Altschul et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)]検索を行った結果、アクセッション番号 AI178926 のラット脾臓 cDNA 由来の EST(Expression Sequence Tags)が高いスコアでヒットした。この AI178926 の配列情報はラット LTC₄受容体遺伝子の一部の配列を示していることが予想されたので、この配列情報からデザインした配列番号：19 で示されるオリゴヌクレオチドをフォーワードプライマーとし、また、PSEC1046 の遺伝子配列からデザインした配列番号：20 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして PCR 法によって cDNA を取得した。PCR はラット脾臓 cDNA (Clontech 社製) を鋳型として、Pyrobest DNA polymerase を用い 5% DMSO 存在下で 98 °C (10 秒) / 55 °C (30 秒) / 72 °C (2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.3 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR-blunt にクローニングし、得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer を用いて解析した。明らかになった塩基配列を配列番号：21 に示した。同配列は 930 塩基のオープンリーディングフレームを持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列(309 アミノ酸)を配列番号：22 に示した。このアミノ酸配列はヒト LTC₄受容体のアミノ酸配列と 72.6% の相同意を有していた。

実施例 17. ブタ LTC₄受容体の発現と LTC₄との結合実験および LTC₄、LTD₄による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇

以下の実験によって実施例 15 で得たブタ LTC₄受容体 DNA がコードするタンパク質の LTC₄受容体活性を確認した。またこの cDNA がコードするタンパク質を発

現させるために、当該 cDNA をブタゲノム DNA を鋳型として PCR により取得した。PCR に必要なプライマーの塩基配列は、実施例 1 5 で決定した塩基配列情報をもとに設定した。PCR には配列番号：2 3 で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとし、配列番号：2 4 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いた（それぞれの 5' 末端には XbaI site が付加してある）。PCR は Pyrobest DNA polymerase を用い 5% DMSO 存在下で 98 °C (10 秒) / 55 °C (30 秒) / 72 °C (2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pEF-BOS を用いてクローニングした。このプラスミドを pEF-BOS-ブタ LTC₄受容体とした。

実施例 4 と同条件にて pEF-BOS-ブタ LTC₄受容体を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分を調製し、膜画分 20 μg に対して [³H]-LTC₄ の結合実験を行った。pEF-BOS-ブタ LTC₄受容体を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分への [³H]-LTC₄ の特異的結合の飽和曲線を実施例 5 と同様に書いた。また、この結合の Scatchard 分析の結果から、pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分に対する LTC₄ の結合の解離定数は $K_d = 2.89 \text{ nM}$ で、最大結合は $B_{max} = 0.25 \text{ pmol/mg protein}$ であった。

また、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化の測定を実施例 5 と同条件にて HEK293-EBNA 細胞を用いて行った。pEF-BOS-ブタ LTC₄受容体を遺伝子導入した HEK293-EBNA 細胞の LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄ の EC₅₀ = 5.0 nM、LTD₄ の EC₅₀ = 3.3 nM であることがわかった。

以上のように、本ブタ LTC₄受容体は LTC₄ に強い親和性を持ち、LTC₄ および LTD₄ に反応して用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。

実施例18. ラット LTC₄受容体の発現と LTC₄、LTD₄による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化

以下の実験によって実施例16で得たラット LTC₄受容体DNAがコードするタンパク質の LTC₄受容体活性を確認した。実施例16で得たラット LTC₄受容体遺伝子が導入された pCR-blunt を XbaI で消化してラット LTC₄受容体DNAを pEF-BOS に導入した。このプラスミドを pEF-BOS-ラット LTC₄受容体とした。

細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化の測定を実施例5と同条件にて HEK293-EBNA 細胞を用いて行った。pEF-BOS-ラット LTC₄受容体を遺伝子導入した HEK293-EBNA 細胞の LTC₄および LTD₄による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄の EC₅₀=19 nM、LTD₄の EC₅₀=7.7 nM であることがわかった。

以上のように、本ラット LTC₄受容体は LTC₄および LTD₄に反応して用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。

産業上の利用の可能性

本発明によって提供される LTC₄受容体は、ヒトの LTC₄に起因する疾患、例えば気管支炎や皮膚炎等の炎症性疾患、心筋梗塞等の心血管系の疾患、の予防及び/または治療剤としての該受容体作用薬の探索及び評価に有用である。本発明によって LTC₄受容体が精製されたタンパク質として、あるいは LTC₄に応答する形質転換細胞として利用可能となり、LTC₄受容体のインビトロでの結合実験を可能とした。

インビトロでの結合実験は、他の LTC₄受容体として作用するタンパク質の影響の無い、理想的な試験環境を現実のものとする。そして本発明によって提供される LTC₄受容体を用いたスクリーニング方法によって、該受容体の関与する疾患に対する治療薬として有用な化合物を選択することができる。また、本発明の LTC₄

- 45 -

受容体をコードする DNA は LTC₄受容体の製造に利用されるのみならず、LTC₄受容体の変異や異常な発現変動に起因する疾患の診断に有用である。更に LTC₄受容体を認識する抗体は、LTC₄受容体作動薬、診断薬又はポリペプチドの分離精製の手段等に利用することができる。

請求の範囲

1. 配列番号：2、配列番号：18、および配列番号：22のいずれかに記載のアミノ酸配列、または配列番号：2、配列番号：18、および配列番号：2のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および/または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を含み、ロイコトリエンC4受容体活性を有するタンパク質。
2. 配列番号：1、配列番号：17、および配列番号：21のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、ロイコトリエンC4受容体活性を有するタンパク質。
3. 請求項1、または請求項2に記載のタンパク質をコードするDNA。
4. 請求項3に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。
5. 請求項4に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項1または請求項2に記載のタンパク質を製造する方法。
6. 請求項1または請求項2に記載のタンパク質に対する抗体。
7. 次の工程を含む、被験化合物のロイコトリエンC4受容体活性を修飾する活性の検出方法。
 - a) ロイコトリエンC4受容体のリガンドの存在下で請求項1または2に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、
 - b) ロイコトリエンC4受容体活性の変化を測定する工程
8. 次の工程を含むロイコトリエンC4受容体活性を修飾する物質のスクリーニング方法。
 - a) ロイコトリエンC4受容体のリガンドの存在下で請求項1または2に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物

物とを接触させる工程、

b) ロイコトリエンC4受容体活性の変化を測定する工程

c) ロイコトリエンC4受容体活性を修飾する物質を選択する工程

9. 請求項1、または請求項2に記載のロイコトリエンC4受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む抗炎症用、または抗アレルギー用医薬組成物。

10. 請求項1、または請求項2に記載のロイコトリエンC4受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む血管拡張用医薬組成物。

1/8

図 1

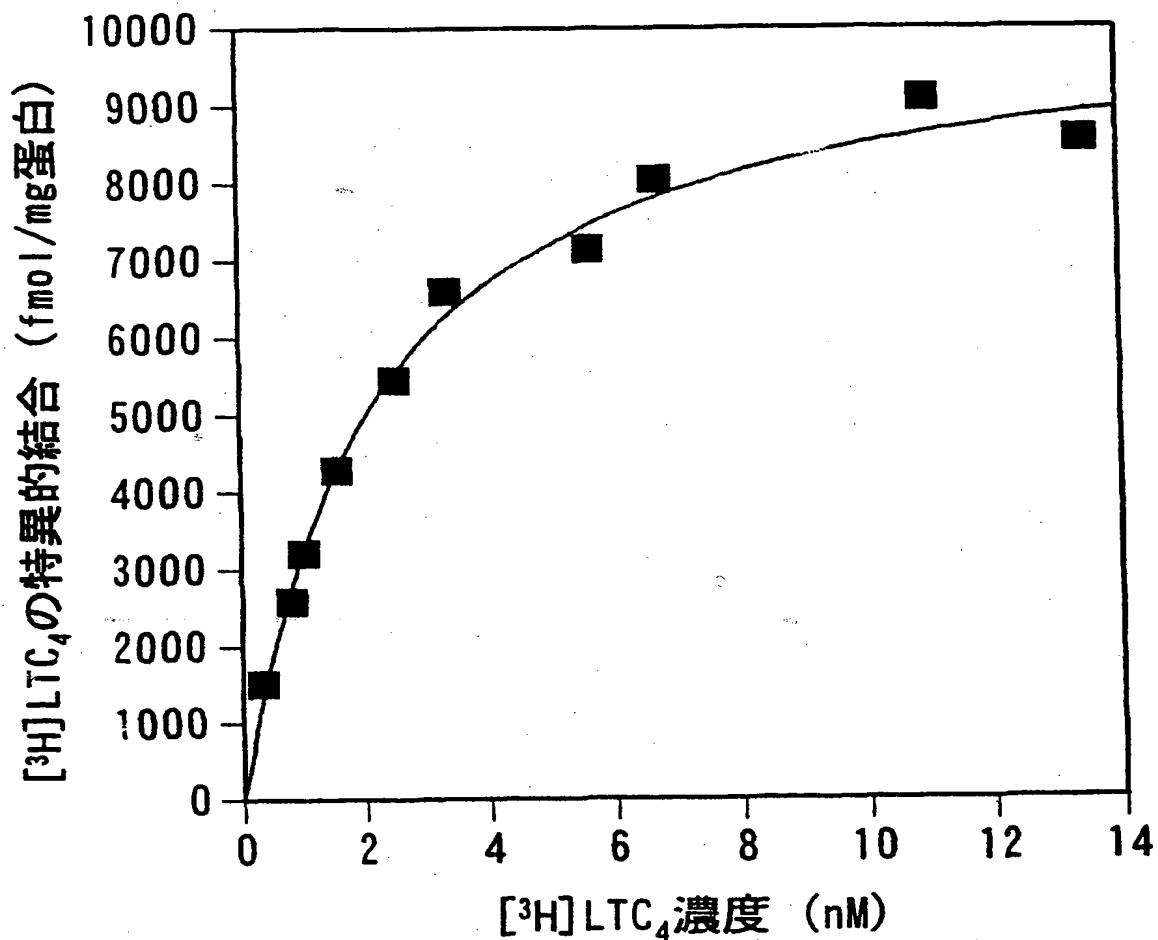


図2

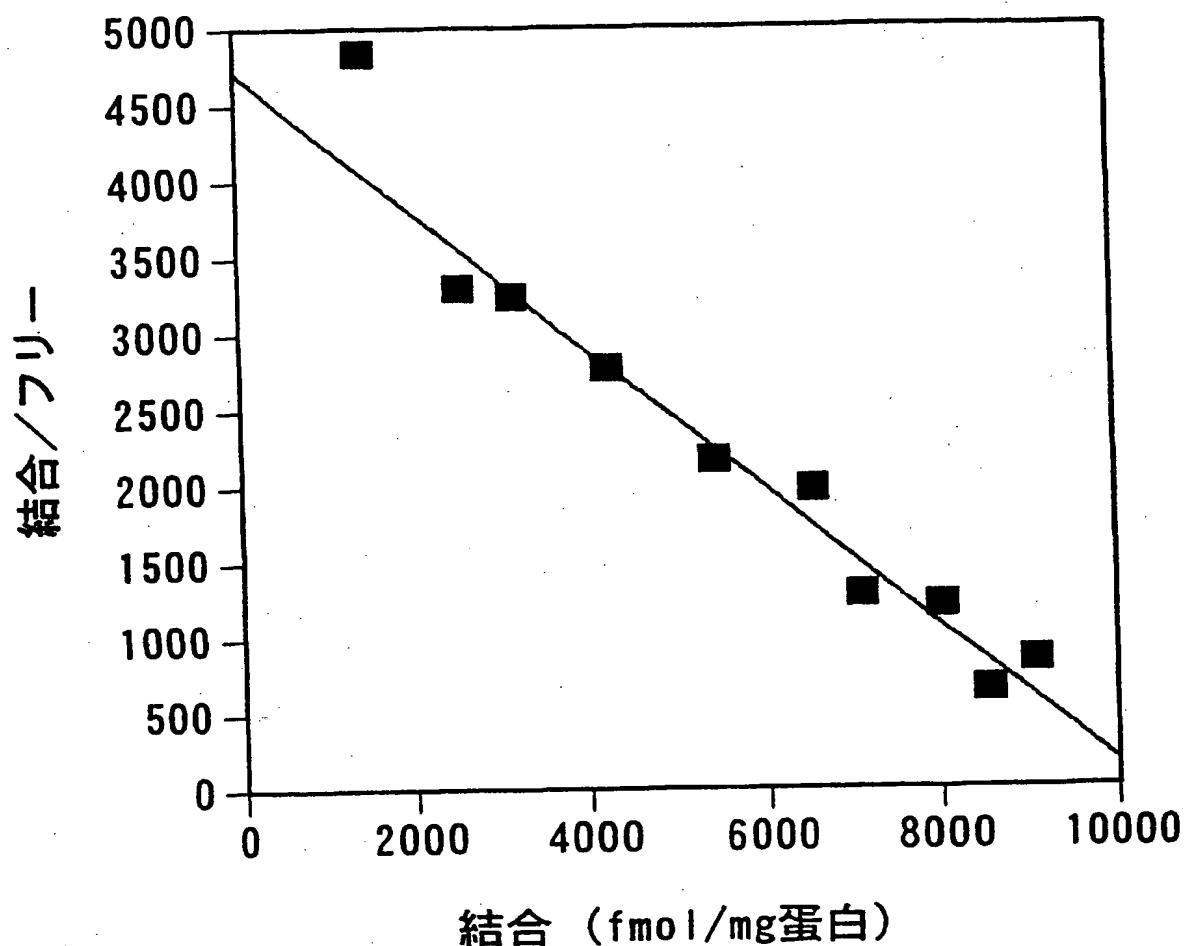


図 3

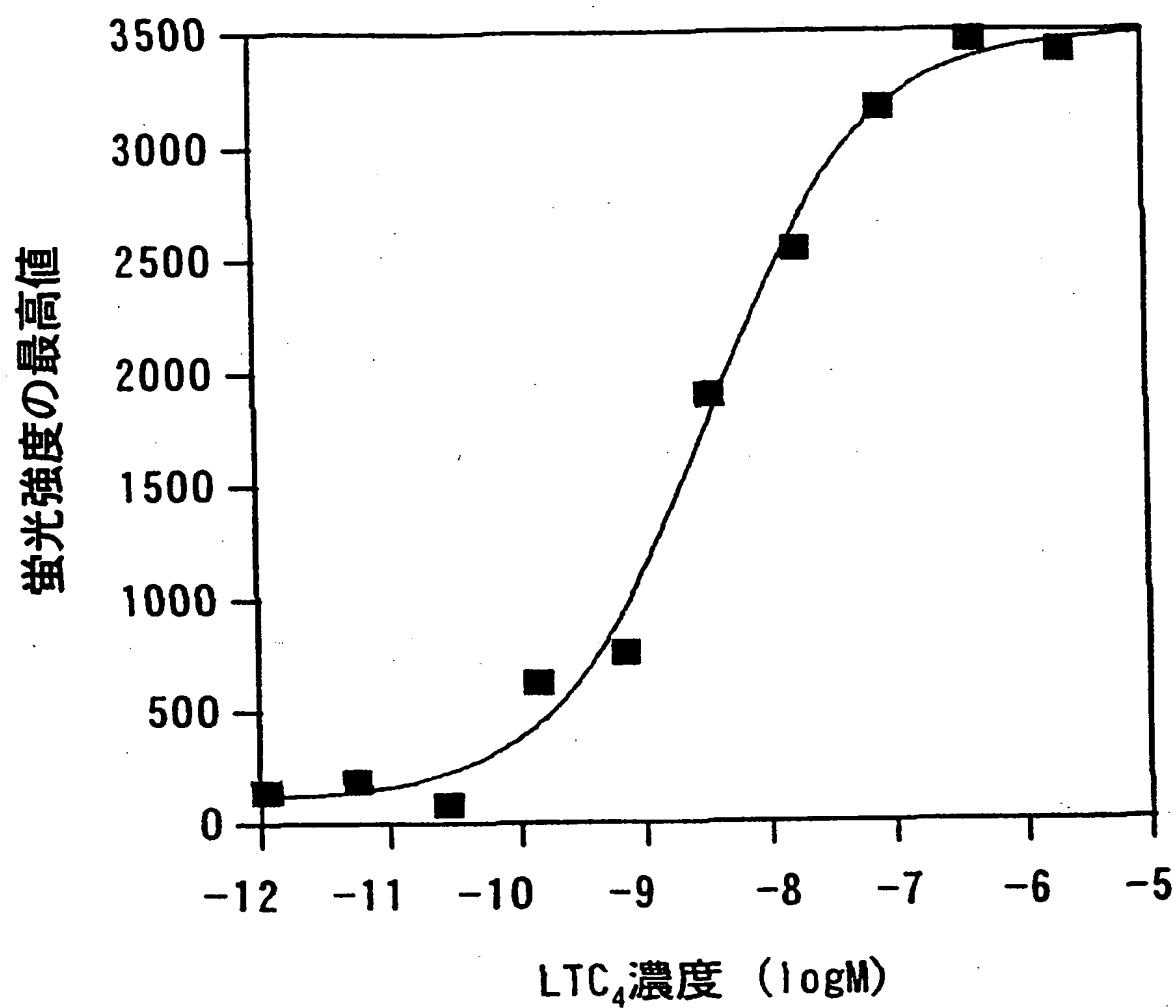


図 4

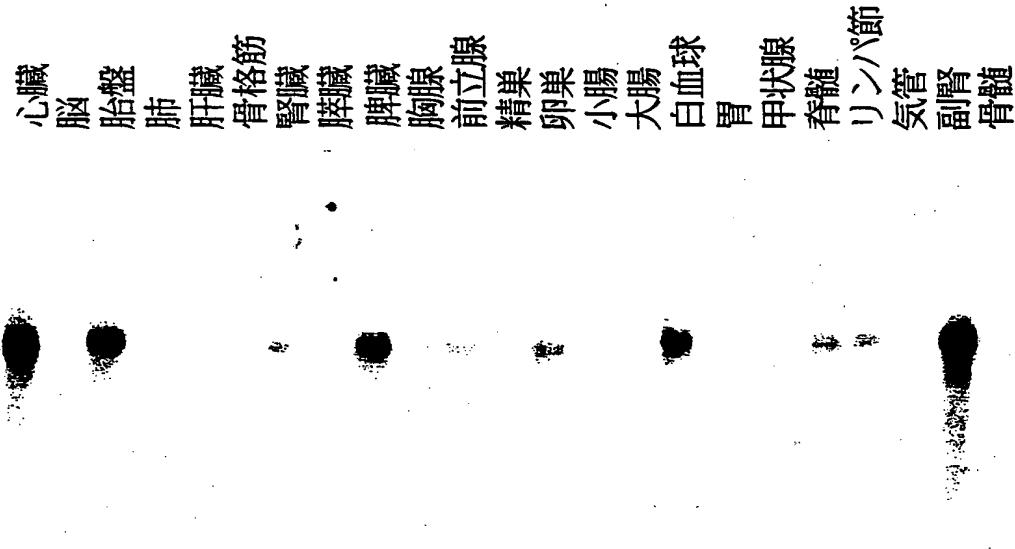
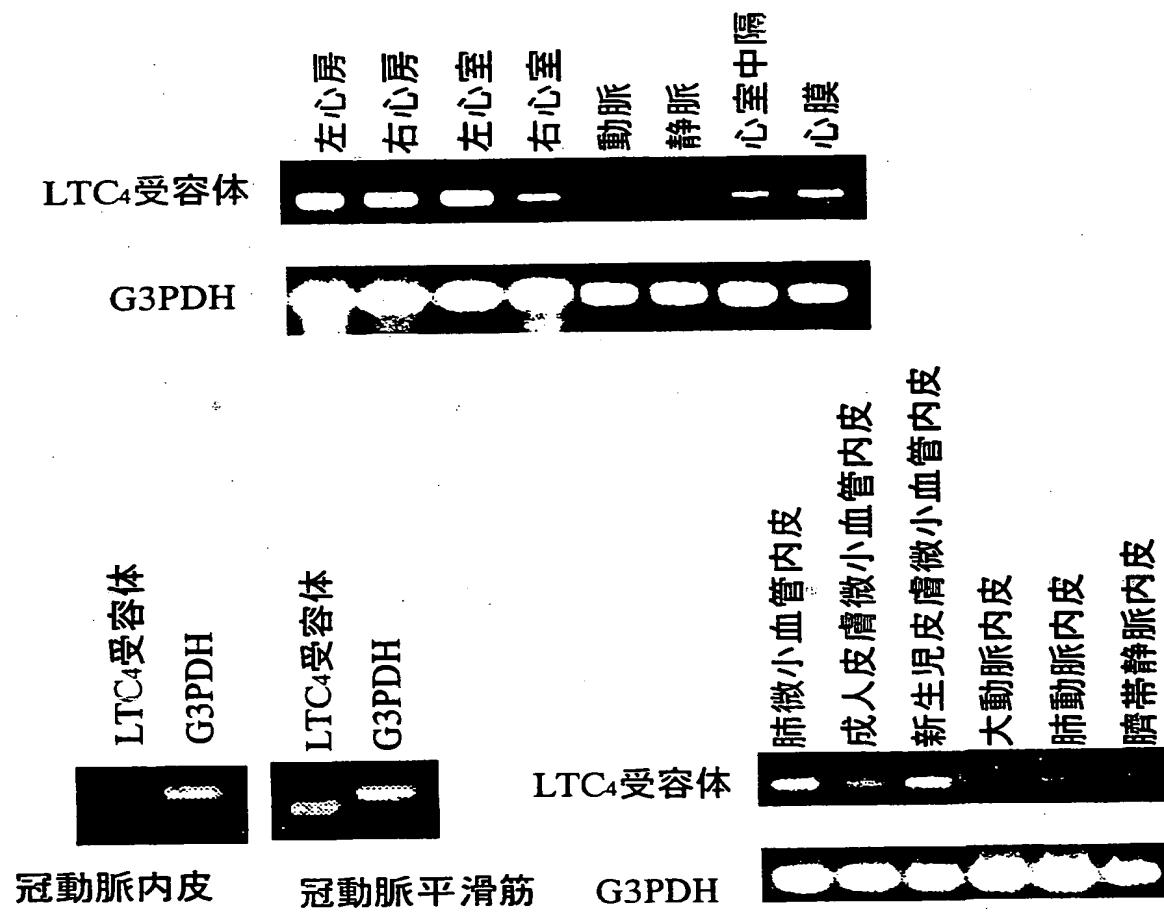
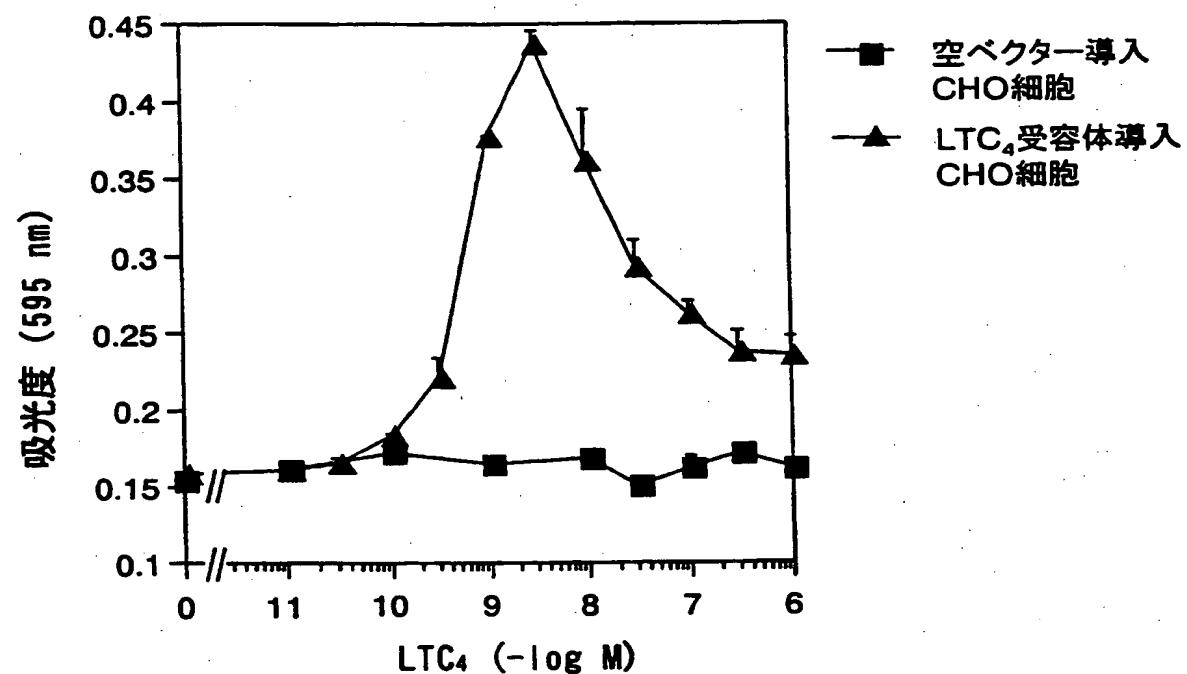


图 5



6/8

図 6



7/8

図 7

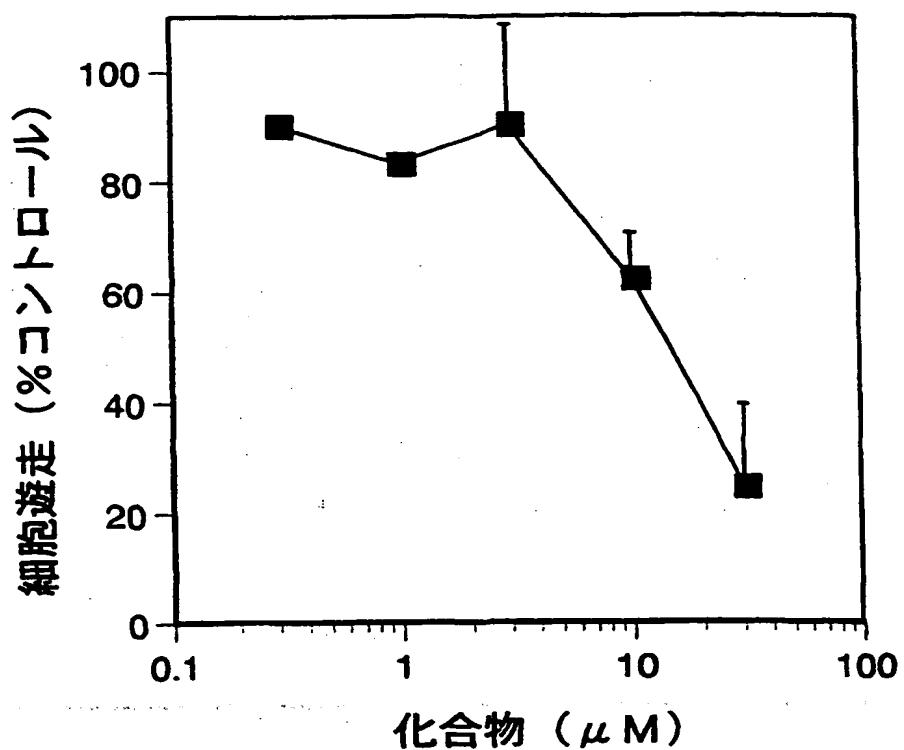
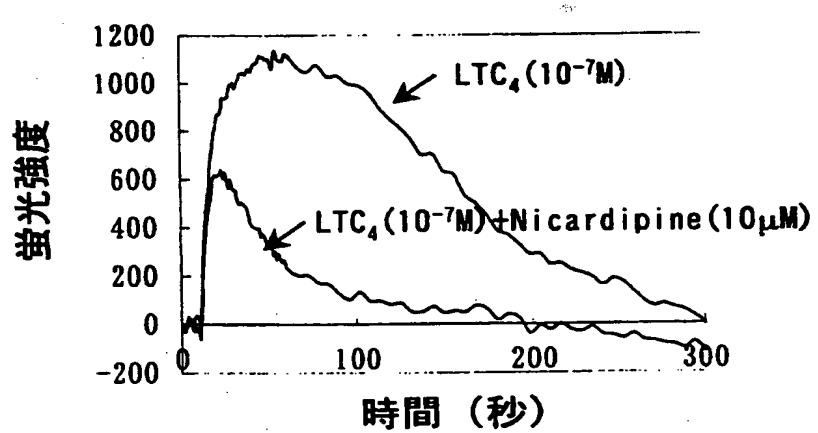
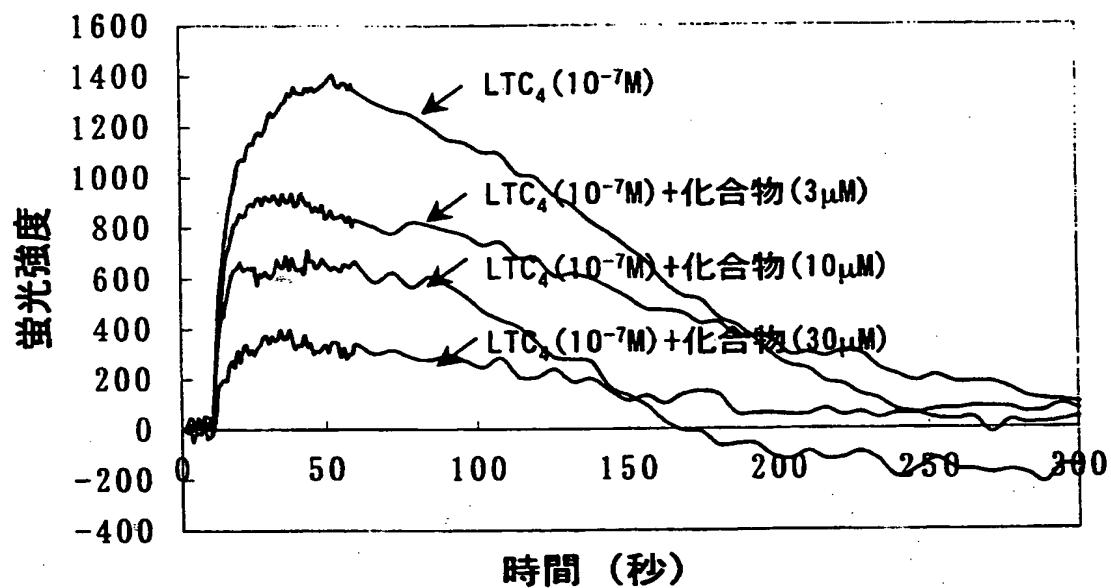


図8



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
Helix Research Institute

<120> Peptide Leukotrien Receptor

<130> YH0022-PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-259986

<151> 1999-09-14

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2807

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (264) . . (1301)

<400> 1

aagttctcta agtttgaagc gtcagcttca accaaacaaa ttaatggcta ttctacattc 60

aaaaatcagg aaatttaaat ttattatgaa atgtaatgca gcatgttagta aagacttaac 120

cagtgtttta aaactcaact ttcaaagaaa agatagtatt gctccctgtt tcattaaaac 180

ctagagagat gtaatcagta agcaagaagg aaaaaggaa attcacaaaag taacttttg 240

2/23

tgtctgtttc ttttaaccc agc atg gag aga aaa ttt atg tcc ttg caa cca 293

Met Glu Arg Lys Phe Met Ser Leu Gin Pro

1

5

10

tcc atc tcc gta tca gaa atg gaa cca aat ggc acc ttc agc aat aac 341

Ser Ile Ser Val Ser Glu Met Glu Pro Asn Gly Thr Phe Ser Asn Asn

15

20

25

aac agc agg aac tgc aca att gaa aac ttc aag aga gaa ttt ttc cca 389

Asn Ser Arg Asn Cys Thr Ile Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Phe Pro

30

35

40

att gta tat ctg ata ata ttt ttc tgg gga gtc ttg gga aat ggg ttg 437

Ile Val Tyr Leu Ile Ile Phe Phe Trp Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu

45

50

55

tcc ata tat gtt ttc ctg cag cct tat aag aag tcc aca tct gtg aac 485

Ser Ile Tyr Val Phe Leu Gin Pro Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asn

60

65

70

gtt ttc atg cta aat ctg gcc att tca gat ctc ctg ttc ata agc acg 533

Val Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Ile Ser Thr

75

80

85

90

ctt ccc ttc agg gct gac tat tat ctt aga ggc tcc aat tgg ata ttt 581

Leu Pro Phe Arg Ala Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Trp Ile Phe

95

100

105

gga gac ctg gcc tgc agg att atg tct tat tcc ttg tat gtc aac atg 629

Gly Asp Leu Ala Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn Met

110

115

120

tac agc agt att tat ttc ctg acc gtg ctg agt gtt gtg cgt ttc ctg 677

Tyr Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu

125

130

135

gca atg gtt cac ccc ttt cgg ctt ctg cat gtc acc acc agc atc agg agt 725
Ala Met Val His Pro Phe Arg Leu Leu His Val Thr Ser Ile Arg Ser
140 145 150

gcc tgg atc ctc tgt ggg atc ata tgg atc ctt atc atg gct tcc tca 773
Ala Trp Ile Leu Cys Gly Ile Ile Trp Ile Leu Ile Met Ala Ser Ser
155 160 165 170

ata atg ctc ctg gac agt ggc tct gag cag aac ggc agt gtc aca tca 821
Ile Met Leu Leu Asp Ser Gly Ser Glu Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser
175 180 185

tgc tta gag ctg aat ctc tat aaa att gct aag ctg cag acc atg aac 869
Cys Leu Glu Leu Asn Leu Tyr Lys Ile Ala Lys Leu Gln Thr Met Asn
190 195 200

tat att gcc ttg gtg gtg ggc tgc ctg ctg cca ttt ttc aca ctc agc 917
Tyr Ile Ala Leu Val Val Gly Cys Leu Leu Pro Phe Phe Thr Leu Ser
205 210 215

atc tgt tat ctg ctg atc att cgg gtt ctg tta aaa gtg gag gtc cca 965
Ile Cys Tyr Leu Leu Ile Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Val Pro
220 225 230

gaa tcg ggg ctg cgg gtt tct cac agg aag gca ctg acc acc atc atc 1013
Glu Ser Gly Leu Arg Val Ser His Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Ile
235 240 245 250

atc acc ttg atc atc ttc ttc ttg tgt ttc ctg ccc tat cac aca ctg 1061
Ile Thr Leu Ile Ile Phe Phe Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Thr Leu
255 260 265

agg acc gtc cac ttg acg aca tgg aaa gtg ggt tta tgc aaa gac aga 1109
Arg Thr Val His Leu Thr Thr Trp Lys Val Gly Leu Cys Lys Asp Arg
270 275 280

4/23

ctg cat aaa gct ttg gtt atc aca ctg gcc ttg gca gca gcc aat gcc 1157
Leu His Lys Ala Leu Val Ile Thr Leu Ala Leu Ala Ala Asn Ala
285 290 295

tgc ttc aat cct ctg ctc tat tac ttt gct ggg gag aat ttt aag gac 1205
Cys Phe Asn Pro Leu Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp
300 305 310

aga cta aag tct gca ctc aga aaa ggc cat cca cag aag gca aag aca 1253
Arg Leu Lys Ser Ala Leu Arg Lys Gly His Pro Gin Lys Ala Lys Thr
315 320 325 330

aag tgt gtt ttc cct gtt agt gtg tgg ttg aga aag gaa aca aca gta 1301
Lys Cys Val Phe Pro Val Ser Val Trp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Val
335 340 345

taaggagctc ttagatgaga cctgttcttg tatccttg tccatcttca ttcactcata 1361

gtctccaaat gactttgtat ttacatcaact cccaaacaaat gttgattctt aatatttgt 1421

tgaccattac ttttgttaat aagacctact tcaaaaaattt tattcagtgt attttcagg 1481

gttgagtcctt aatgagggat acaggaggaa aaatccctac tagagccctg tgggctgaaa 1541

tatcagactg ggaaaaaatg caaagcacat tggatcctac tttcttcag atattgaacc 1601

agatctctgg cccatcaggc tttctaaatt cttcaaaaga gccacaactt ccccagcttc 1661

tccagctccc ctgtcctctt caatcccttg agatatacg actaacgacg ctactggaag 1721

ccccagagca gaaaagaagc acatcctaag attcaggagaa agactaactg tgaaaaggaa 1781

ggctgtccta taacaaagca gcatcaagtc ccaagtaagg acagtgagag aaaaggggaa 1841

gaaggattgg agcaaaaagag aactggcaat aagtagggaa aggaagaatt tcattttgca 1901

5/23

ttgggagaga ggttctaaca cactgaaggc aaccctattt ctactgttc tctcttgcca 1961

gggttattagg aaggacagga aaagttaggag gaggatctgg ggcattgccc taggaaatga 2021

aagaatttgt tatagaatgg aagggggatc atcaaggaca tgtatctcaa attttcttg 2081

agatgcaggt tagttgacct tgctgcagtt ctccctccca ttaattcatt gggatggaag 2141

ccaaaaataa aagaggtgcc tctgaggatt agggttgagc actcaaggaa aagatggagt 2201

agagggcaaa tagcaaaaagt tggtgactc ctgaaattct attaacattt ccgcagaaga 2261

tgagtaggga gatgctgcct tccctttga gatagtgtag aaaaacacta gatagtgtga 2321

gaggttccct tctgtccatt gaaacaaggc taaggatact accaactact atcaccatga 2381

ccattgtact gacaacaatt gaatgcagtc tccctgcagg gcagattatg ccagggactt 2441

tacatttgtt gatcccattt gacattcaca ccaaagctct gagttccatt ttacagctga 2501

agaaaattgaa gcttagagaa attaagaagc ttgttaagt ttacacagct agtaagagtt 2561

ttaaaaatct ctgtcagaa gtgttggctg ggtgctctcc ccaccactac ccttgtaaac 2621

ttccaggaag attgggtgaa agtctgaata aaagctgtcc tttcctacca atttcctccc 2681

cctcctcaact ctcacaagaa aaccaaaaagt ttctcttcag agttgttgac tcatagtaca 2741

gtaaagggtg gaggtgatata ggcattctga aagtagggag ggactaagtc agtcgtcata 2801

ctaaac

2807

<210> 2

<211> 346

6/23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Arg Lys Phe Met Ser Leu Gin Pro Ser Ile Ser Val Ser Glu

1 5 10 15

Met Glu Pro Asn Gly Thr Phe Ser Asn Asn Asn Ser Arg Asn Cys Thr

20 25 30

Ile Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Phe Pro Ile Val Tyr Leu Ile Ile

35 40 45

Phe Phe Trp Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Ser Ile Tyr Val Phe Leu

50 55 60

Gln Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Phe Met Leu Asn Leu

65 70 75 80

Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Ile Ser Thr Leu Pro Phe Arg Ala Asp

85 90 95

Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Trp Ile Phe Gly Asp Leu Ala Cys Arg

100 105 110

Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn Met Tyr Ser Ser Ile Tyr Phe

115 120 125

Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu Ala Met Val His Pro Phe

130 135 140

Arg Leu Leu His Val Thr Ser Ile Arg Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly

145 150 155 160

Ile Ile Trp Ile Leu Ile Met Ala Ser Ser Ile Met Leu Leu Asp Ser

165 170 175

7/23

Gly Ser Glu Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser Cys Leu Glu Leu Asn Leu

180 185 190

Tyr Lys Ile Ala Lys Leu Gln Thr Met Asn Tyr Ile Ala Leu Val Val

195 200 205

Gly Cys Leu Leu Pro Phe Phe Thr Leu Ser Ile Cys Tyr Leu Leu Ile

210 215 220

Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu Ser Gly Leu Arg Val

225 230 235 240

Ser His Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Ile Ile Thr Leu Ile Ile Phe

245 250 255

Phe Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Thr Leu Arg Thr Val His Leu Thr

260 265 270

Thr Trp Lys Val Gly Leu Cys Lys Asp Arg Leu His Lys Ala Leu Val

275 280 285

Ile Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Cys Phe Asn Pro Leu Leu

290 295 300

Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg Leu Lys Ser Ala Leu

305 310 315 320

Arg Lys Gly His Pro Gln Lys Ala Lys Thr Lys Cys Val Phe Pro Val

325 330 335

Ser Val Trp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Val

340 345

8/23

<210> 3

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligo-cap linker sequence

<400> 3

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligo (dT) primer sequence

<400> 4

gcggctgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt

42

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 5

9/23

agcatcgagt cggccttgg t

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

gggtctagaa tggagagaaa atttatgtcc ttgc

34

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

10/23

synthesized primer sequence

<400> 8

gggtctagac tattatactc ttgtttcctt tctcaaccac

40

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

tggatcctct gtgggatcat atgg

24

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

aattctcccc agcaaagtaa tagag

25

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

11/23

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

gttaaaagtg gaggtcccaag aatcggggct

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

agaaaaggctg atggggcaga gatctggttc

30

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

cacaaaatcaa ctttttgtt ctgtttc

27

<210> 14

12/23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

ttctccccag caaagtaata gag

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

tggatccctct gtgggatcat atgg

24

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

aacaggcttc atctaag

17

13/23

<210> 17

<211> 1101

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CDS

<222> (14)..(1048)

<400> 17

tttttaattc agc atg gag aga aaa ctt atg tcc tta ctt cca tcc atc 49

Met Glu Arg Lys Leu Met Ser Leu Leu Pro Ser Ile

1

5

10

tcc cta tca gaa atg gaa ccc aat agt acc ttg ggc aat cac aat agc 97
Ser Leu Ser Glu Met Glu Pro Asn Ser Thr Leu Gly Asn His Asn Ser

15

20

25

aac agg agc tgc acc aca gaa aac ttc aag aga gaa ttt tac ccc att 145
Asn Arg Ser Cys Thr Thr Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Tyr Pro Ile

30

35

40

gtg tac cta gta ata ttt atc tgg gga gcc ttg gga aat ggc ttt tct 193
Val Tyr Leu Val Ile Phe Ile Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly Phe Ser
45 50 55 60ata tat gtt ttc ctg aaa cct tat aag aag tcc aca tca gtc aat gtt 241
Ile Tyr Val Phe Leu Lys Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val
65 70 75ttc atg cta aat ctg gcc att tcg gat ctc tta ttc aca atc aca ctg 289
Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Thr Ile Thr Leu
80 85 90

14/23

ccc ttc agg gtt gac tat tac ctt aga ggc tcc aac ygg ata ttt ggg 337
 Pro Phe Arg Val Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Xaa Ile Phe Gly

95 100 105

gac aca cct tgc agg att atg tct tat tct atg tat gtc aac atg tac 385
 Asp Thr Pro Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Met Tyr Val Asn Met Tyr
 110 115 120

agc agc att tat ttc ctg act gtg ctg agt gtt gtg cgt ttc ctg gca 433
 Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu Ala
 125 130 135 140

act gtt cac ccc ttc cgg ctc ctt cat acc acc agc atc aag aac gcc 481
 Thr Val His Pro Phe Arg Leu Leu His Thr Thr Ser Ile Lys Asn Ala
 145 150 155

tgg att ctc tgt ggg gtc ata tgg atc ttt att atg gct tcc tca aca 529
 Trp Ile Leu Cys Gly Val Ile Trp Ile Phe Ile Met Ala Ser Ser Thr
 160 165 170

gta ctt ctg aag aat ggc tct gag cag aaa gac aat gtc aca ttg tgc 577
 Val Leu Leu Lys Asn Gly Ser Glu Gln Lys Asp Asn Val Thr Leu Cys
 175 180 185

tta gag ctg aat tct aat aaa gtt act aaa ctg aag acc atg aac tac 625
 Leu Glu Leu Asn Ser Asn Lys Val Thr Lys Leu Lys Thr Met Asn Tyr
 190 195 200

gtt gcc ttg gtg ggc ttt gtg ctg cca ttc ggc act ctc agc atc 673
 Val Ala Leu Val Val Gly Phe Val Leu Pro Phe Gly Thr Leu Ser Ile
 205 210 215 220

tgc tac ctg cta atc att cga gct ttg tta aag gta gag gtc ccg gag 721
 Gys Tyr Leu Leu Ile Ile Arg Ala Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu
 225 230 235

15/23

tcc ggg ctg cgg ctt tct cac agg aag gca ttg atc acc gtc atc att 769
 Ser Gly Leu Arg Leu Ser His Arg Lys Ala Leu Ile Thr Val Ile Ile

240 245 250

gct ttg atc atc ttt ctc ctg tgt ttc ctg ccc tat cac gta ctg aga 817
 Ala Leu Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Val Leu Arg

255 260 265

acc ctt cac ctg ctc gaa tgg aaa gct gat aaa tgc aaa gac agg ctg 865
 Thr Leu His Leu Leu Glu Trp Lys Ala Asp Lys Cys Lys Asp Arg Leu

270 275 280

cat aaa gct gtg gct gtc aca cta gct ttg gca gcg gcc aac agc tgc 913
 His Lys Ala Val Ala Val Thr Leu Ala Leu Ala Ala Asn Ser Cys

285 290 295 300

ttc aat cct ttc ctc tat tac ttt gct ggg gag aat ttt aag gac aga 961
 Phe Asn Pro Phe Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg

305 310 315

cta aag tct gca ctc agg aaa ggt cga cca cag aaa aca agg tgc ggt 1009
 Leu Lys Ser Ala Leu Arg Lys Gly Arg Pro Gin Lys Thr Arg Cys Gly

320 325 330

ttc tct gtc tgt gtg tgg ctg aaa aag gaa acg aga gtg taagggatta 1058
 Phe Ser Val Cys Val Trp Leu Lys Lys Glu Thr Arg Val

335 340 345

ttaggtgagg ctgttattat gtccttggcc ttgtgtctac ccc 1101

<210> 18

<211> 345

<212> PRT

<213> Sus scrofa

16/23

<400> 18

Met Glu Arg Lys Leu Met Ser Leu Leu Pro Ser Ile Ser Leu Ser Glu

1 5 10 15

Met Glu Pro Asn Ser Thr Leu Gly Asn His Asn Ser Asn Arg Ser Cys

20 25 30

Thr Thr Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Tyr Pro Ile Val Tyr Leu Val

35 40 45

Ile Phe Ile Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly Phe Ser Ile Tyr Val Phe

50 55 60

Leu Lys Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Phe Met Leu Asn

65 70 75 80

Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Thr Ile Thr Leu Pro Phe Arg Val

85 90 95

Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Xaa Ile Phe Gly Asp Thr Pro Cys

100 105 110

Arg Ile Met Ser Tyr Ser Met Tyr Val Asn Met Tyr Ser Ser Ile Tyr

115 120 125

Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu Ala Thr Val His Pro

130 135 140

Phe Arg Leu Leu His Thr Thr Ser Ile Lys Asn Ala Trp Ile Leu Cys

145 150 155 160

Gly Val Ile Trp Ile Phe Ile Met Ala Ser Ser Thr Val Leu Leu Lys

165 170 175

Asn Gly Ser Glu Gln Lys Asp Asn Val Thr Leu Cys Leu Glu Leu Asn

180 185 190

17/23

Ser Asn Lys Val Thr Lys Leu Lys Thr Met Asn Tyr Val Ala Leu Val

195 200 205

Val Gly Phe Val Leu Pro Phe Gly Thr Leu Ser Ile Cys Tyr Leu Leu

210 215 220

Ile Ile Arg Ala Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu Ser Gly Leu Arg

225 230 235 240

Leu Ser His Arg Lys Ala Leu Ile Thr Val Ile Ile Ala Leu Ile Ile

245 250 255

Phe Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Val Leu Arg Thr Leu His Leu

260 265 270

Leu Glu Trp Lys Ala Asp Lys Cys Lys Asp Arg Leu His Lys Ala Val

275 280 285

Ala Val Thr Leu Ala Leu Ala Ala Asn Ser Cys Phe Asn Pro Phe

290 295 300

Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg Leu Lys Ser Ala

305 310 315 320

Leu Arg Lys Gly Arg Pro Gin Lys Thr Arg Cys Gly Phe Ser Val Cys

325 330 335

Val Trp Leu Lys Lys Glu Thr Arg Val

340 345

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

18/23

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

atatgtctga tgcctgccaa

20

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 20

agtcatttgg agactatgag tg

22

<210> 21

<211> 1249

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (208)..(1134)

<400> 21

atatgtctga tgcctgccaa ggtcagaaga gggtgtcgga gaaacttgct tctcgccatg 60

tgagatggag tacggcaa at gtttgcac taatcaggaa gaaaagtggaa attgtatgaa 120

gtaactttt gggtttattt ctttttaaac taatataaaag agaaaaacttt atatttagtcc 180

ttgccttgt ccaactccat attagaa atg gga gta act ggg acc ccc agc tat 234
Met Gly Val Thr Gly Thr Pro Ser Tyr

tat agt gac aag aac tgt aca ata gaa aac ttc aag agg gac ttt tac 282
 Tyr Ser Asp Lys Asn Cys Thr Ile Glu Asn Phe Lys Arg Asp Phe Tyr
 10 15 20 25

cct atc atc tac ctg ata ata ttt gtc tgg gga gcc ttg gga aat ggc 330
 Pro Ile Ile Tyr Leu Ile Ile Phe Val Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly
 30 35 40

ttt tcc ata tat gtc ttc cta cag act tac aag aag tcc aca tct gtg 378
 Phe Ser Ile Tyr Val Phe Leu Gln Thr Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val
 45 50 55

aat gtt ttc atg ctc aac ctg gcc att tca gat ttc cta ttc ata agc 426
 Asn Val Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Phe Ile Ser
 60 65 70

acc ctg ccc ttc agg gct gac tat aat ttc aga ggt tct gat tgg ata 474
 Thr Leu Pro Phe Arg Ala Asp Tyr Asn Phe Arg Gly Ser Asp Trp Ile
 75 80 85

ttt ggg gac tgg gcc tgc aga att atg tct tat tct tta tat gtc aac 522
 Phe Gly Asp Trp Ala Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn
 90 95 100 105

atg tat act agc att tat ttc cta act gtg ctg agt att gtg cgc ttc 570
Met Tyr Thr Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Ile Val Arg Phe
110 115 120

ctg gcc act gcc cac ccc ttc cag atg ctc cat atc acc acc agc gtt agg 618

20/23

Leu Ala Thr Ala His Pro Phe Gln Met Leu His Ile Thr Ser Val Arg

125

130

135

agt gcc tgg atc ctc tgt ggg att ata tgg gtc ttc atc atg gct tcc 666

Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly Ile Ile Trp Val Phe Ile Met Ala Ser

140

145

150

tca gga ctg ctt ctg aag cat ggc caa gag aag aaa aat aac act aca 714

Ser Gly Leu Leu Leu Lys His Gly Gln Glu Lys Lys Asn Asn Thr Thr

155

160

165

ttg tgc ttt gag ctg aat ctc caa aag ttt aaa aat ctc gtc atc ttg 762

Leu Cys Phe Glu Leu Asn Leu Gln Lys Phe Lys Asn Leu Val Ile Leu

170

175

180

185

aac tac att gca tta ggg gtg ggc ttc ttg ctt cca ttt ttc ata ctc 810

Asn Tyr Ile Ala Leu Gly Val Gly Phe Leu Leu Pro Phe Phe Ile Leu

190

195

200

acc atc tgc tac ctg ttg atc atc cgg gtc ttg tta aag gtg gag att 858

Thr Ile Cys Tyr Leu Leu Ile Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Ile

205

210

215

cca gaa tca ggt cca cgg gat gct cag agg aag gca ctg acc act atc 906

Pro Glu Ser Gly Pro Arg Asp Ala Gln Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile

220

225

230

gtc att gcc atg atc atc ttc ctc tgt ttt ctg cca tac cat gca 954

Val Ile Ala Met Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Ala

235

240

245

ctt cgg acc atc cac ttg gtc aca tgg gat gca gat tca tgt atg gat 1002

Leu Arg Thr Ile His Leu Val Thr Trp Asp Ala Asp Ser Cys Met Asp

250

255

260

265

gaa tta cat aag gcc acg gtc atc act ctg acc ttg gct gca gcc aac 1050

21/23

Glu Leu His Lys Ala Thr Val Ile Thr Leu Thr Leu Ala Ala Ala Asn
270 275 280

agc tgc ttc aat ccc ttt ctc tat tat ttt gct gga gag aat ttc aaa 1098
Ser Cys Phe Asn Pro Phe Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys
285 290 295

gca cga tta agg gct ata ttc agc aaa gat cat cta tagaaagcaa 1144
Ala Arg Leu Arg Ala Ile Phe Ser Lys Asp His Leu
300 305

agtcaaagtg cagccttcctt atttgtgtat tactgaagac cagagttaag agcataaggg 1204

gctgttctgg aggtacgctc atgaacactg gtgtccacct tcact 1249

<210> 22

<211> 309

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 22

Met Gly Val Thr Gly Thr Pro Ser Tyr Tyr Ser Asp Lys Asn Cys Thr
1 5 10 15

Ile Glu Asn Phe Lys Arg Asp Phe Tyr Pro Ile Ile Tyr Leu Ile Ile
20 25 30

Phe Val Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly Phe Ser Ile Tyr Val Phe Leu
35 40 45

Gln Thr Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Phe Met Leu Asn Leu
50 55 60

Ala Ile Ser Asp Phe Leu Phe Ile Ser Thr Leu Pro Phe Arg Ala Asp
65 70 75 80

22/23

Tyr Asn Phe Arg Gly Ser Asp Trp Ile Phe Gly Asp Trp Ala Cys Arg

85 90 95

Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn Met Tyr Thr Ser Ile Tyr Phe

100 105 110

Leu Thr Val Leu Ser Ile Val Arg Phe Leu Ala Thr Ala His Pro Phe

115 120 125

Gln Met Leu His Ile Thr Ser Val Arg Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly

130 135 140

Ile Ile Trp Val Phe Ile Met Ala Ser Ser Gly Leu Leu Leu Lys His

145 150 155 160

Gly Gln Glu Lys Lys Asn Asn Thr Thr Leu Cys Phe Glu Leu Asn Leu

165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asn Leu Val Ile Leu Asn Tyr Ile Ala Leu Gly Val

180 185 190

Gly Phe Leu Leu Pro Phe Phe Ile Leu Thr Ile Cys Tyr Leu Leu Ile

195 200 205

Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Ile Pro Glu Ser Gly Pro Arg Asp

210 215 220

Ala Gln Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Val Ile Ala Met Ile Ile Phe

225 230 235 240

Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Ala Leu Arg Thr Ile His Leu Val

245 250 255

Thr Trp Asp Ala Asp Ser Cys Met Asp Glu Leu His Lys Ala Thr Val

260 265 270

23/23

Ile Thr Leu Thr Leu Ala Ala Ala Asn Ser Cys Phe Asn Pro Phe Leu

275

280

285

Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Ala Arg Leu Arg Ala Ile Phe

290

295

300

Ser Lys Asp His Leu

305

<210> 23

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 23

gggtctagaa tggagagaaa acttatgtcc ttacttc

37

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 24

ccctctagac tattacactc tcgtttcctt tttcagccac

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, 16/28, C12P21/02,
C12Q1/02, A61K31/422, A61P43/00, 9/08, C07D413/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, 16/28, C12P21/02,
C12Q1/02, A61K31/422, A61P43/00, 9/08, C07D413/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.274, No.2, (August 2000), Takasaki J., et al. "The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT (2) receptor", pp.316-322	1-10
A	Nature, Vol.399, (June 1999), Kevin R. Lynch, et al., "Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor", pp.789-79	1-10
A	Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol.275, No.1, (October 1995), Pries S. et al., "Leukotriene C4 receptors on guinea pig tracheocytes", pp.312-318	1-10
A	Molecular Pharmacology, Vol.53, No.4, (April 1998), Valerie Capra et al., "Identification and Characterization of Two Cysteinyl-Leukotriene High Affinity Binding Sites with Receptor Characteristics in Human Lung Parenchyma", pp.750-758	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
24 October, 2000 (24.10.00)Date of mailing of the international search report
07 November, 2000 (07.11.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/12, C07K14/705, 16/28, C12P21/02,
C12Q1/02, A61K31/422, A61P43/00, 9/08, C07D413/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/12, C07K14/705, 16/28, C12P21/02,
C12Q1/02, A61K31/422, A61P43/00, 9/08, C07D413/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.274, No.2, (8月.2000), Takasaki J., et al. "The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor", p.316-322	1-10
A	Nature, Vol.399, (6月.1999), Kevin R. Lynch, et al. "Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor", p.789-793	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリーエ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 10. 00

国際調査報告の発送日

07.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

印

4B 9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol.275, No.1, (10月.1995), Prie S. et al. "Leukotriene C4 receptors on guinea pig tracheocytes", p.312-318	1-10
A	Molecular Pharmacology, Vol.53, No.4, (4月.1998), Valerie Capra et al. "Identification and Characterization of Two Cysteinyl-Leukotriene High Affinity Binding Sites with Receptor Characteristics in Human Lung Parenchyma", p.750-758	1-10

THIS PAGE BLANK (WSF70)